



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DE CALRETICULINA RECOMBINANTE HUMANA
VERSUS PARASITARIA DE *Trypanosoma cruzi* SOBRE LA
REGENERACIÓN ÓSEA EN CONEJOS

PATRICIA BRAVO REYES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Cs. Clínicas.

PROFESOR GUÍA: JOSÉ IGNACIO ARIAS FERNÁNDEZ

**FONDECYT 3100021
SANTIAGO-CHILE
2013**

Evaluación de calreticulina recombinante humana *versus* parasitaria de *Trypanosoma cruzi* sobre la regeneración ósea en conejos

Evaluation of human *versus* *Trypanosoma cruzi* recombinant calreticulin on bone regeneration in rabbits

Patricia Edith Bravo Reyes*

*Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Financiamiento FONDECYT 3100021.

RESUMEN

En cirugía ortopédica, el uso de factores tróficos que favorezcan la formación de tejido de granulación y eviten o retrasen la formación de nuevo hueso es deseable en resoluciones quirúrgicas de ciertas patologías en pequeños animales. Calreticulina (CRT) es una proteína chaperona que asegura el correcto plegamiento de proteínas y actúa en la regulación del metabolismo del calcio dentro del retículo endoplásmico (RE). Esta proteína ha sido localizada además fuera de la célula donde cumple variadas funciones, entre ellas, favorece la formación de tejido de granulación en piel y además, inhibe la formación de hueso. Es así como, en este estudio se evaluó y se comparó el efecto de CRT recombinante humana (rHuCRT) y parasitaria proveniente de *Trypanosoma cruzi* (rTcCRT) sobre la regeneración ósea, mediante liberación controlada desde una esponja de quitosano al interior de una lesión circular en hueso cortical de conejo. rHuCRT y rTcCRT demostraron inhibir la regeneración ósea *in vivo*, sin embargo, rTcCRT demostró ser más eficaz en esta función que su contraparte humana.

PALABRAS CLAVES: Calreticulina, *Trypanosoma cruzi*, regeneración ósea.

ABSTRACT

In orthopedic, the use of trophic factors that favor the formation of granulation tissue and prevent or delay the formation of new bone is desirable in certain resolutions in surgery small animal pathologies. Calreticulin (CRT) is a chaperone protein that ensures the proper folding of proteins and acts in the regulation of the calcium metabolism in the endoplasmic reticulum (ER). In addition, CRT is located outside the cell where it favors the formation of granulation of skin tissue and it also, inhibits the formation of bone. In this study was the effect of human recombinant CRT (rHuCRT) and *Trypanosoma cruzi* CRT (rTcCRT) evaluated and compared on bone regeneration, through chitosan sponge controlled release in the interior of a circular cortical bone lesion in rabbits. rHuCRT and rTcCRT showed an inhibition of bone regeneration *in vivo*, however, rTcCRT proved to be approximately 400 times more effective in this role than his human counterpart.

KEYWORDS: Calreticulin, *Trypanosoma cruzi*, bone regeneration.

INTRODUCCIÓN

En cirugía ortopédica los mayores esfuerzos se centran en lograr la regeneración ósea. Sin embargo, en la ortopedia veterinaria existen algunas técnicas quirúrgicas en que se requiere justamente lo contrario, es decir, que no se forme nuevo hueso o se retrase su formación. Para esto se ha estudiado el uso de factores que favorezcan la formación de tejido de granulación y eviten o retrasen la formación de nuevo hueso (Arias *et al.*, 2008). Sin embargo, los factores tróficos que favorecen la formación de tejido de granulación resultan también estimuladores de la neo formación ósea.

Una molécula que ha demostrado favorecer la formación de tejido de granulación en piel y además inhibir la formación de hueso es la proteína llamada calreticulina (CRT) (Michalak *et al.*, 2009).

Encontrada originalmente en células musculares de conejo (Ostwald y MacLennan, 1974), CRT es una proteína del retículo endoplásmico (RE) ampliamente distribuida en las células eucariotas. Se encuentra involucrada en muchas funciones celulares, como chaperona tipo lectina, en el almacenamiento y señalización de Ca^{2+} , en la regulación de la expresión génica de diferentes proteínas, entre otras (Michalak *et al.*, 2009). Actualmente, se sabe que además de localizarse al interior de la célula, lo hace también en la superficie celular y en forma extracelular, regulando así una variedad de procesos biológicos importantes (Gold *et al.*, 2010).

La CRT se expresa en las células de diferentes mamíferos y sus funciones extracelulares han sido probadas en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, demostrando que tiene un importante rol en la cicatrización de heridas y diversos procesos asociados con la reparación cutánea (Gold *et al.*, 2010; Nanney *et al.*, 2008), en la inhibición de la angiogénesis (López *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2010), también posee un efecto antitumoral (López *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2010; (Ramírez *et al.*, 2011) y promoción de la adhesión celular (Michalak *et al.*, 2009).

La actividad biológica extracelular de CRT está muy relacionada con la adhesión y migración celular y la fagocitosis que son aspectos críticos en la reparación de heridas (Nguyen *et al.*, 2009). Estudios demuestran que CRT induce la migración concentración-dependiente de queratinocitos, fibroblastos, macrófagos y monocitos, estimulando de esta forma la cicatrización y reepitelización de heridas por medio del aumento de más del doble de la proliferación celular de cultivos primarios humanos de queratinocitos, fibroblastos, y células endoteliales microvasculares (Nanney *et al.*, 2008).

También se ha visto, que la CRT aplicada tópicamente aumenta la tasa de cicatrización de las heridas cutáneas. Las heridas tratadas con CRT muestran una mayor tasa de epitelización por migración de los queratinocitos y una fuerte inducción de tejido de granulación (neodermis) producido por un mayor número de fibroblastos en comparación a los controles en modelos animales porcinos y murinos (Gold *et al.*, 2010; Arias *et al.*, 2012). Por otra parte, la CRT *in vitro* estimula la migración de monocitos y líneas celulares de macrófagos, explicando el alza de macrófagos tisulares observados en las heridas porcinas tratadas con CRT en comparación con los controles (Gold *et al.*, 2010).

La CRT, además inhibe la formación de nuevo hueso, ya que afecta la diferenciación de condrocitos y osteocitos e inhibe la acumulación de Ca^{+2} en la matriz extracelular y la mineralización de neohueso (Michalak *et al.*, 2009).

Esta proteína también está presente en el protozoo *Trypanosoma cruzi* (Ramos *et al.*, 1991; Aguillón *et al.*, 2000), agente causal de la enfermedad de Chagas en el humano (Chagas, 1909). Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) posee un 50% de identidad con su contraparte humana (HuCRT) (Ferreira *et al.*, 2005), por lo tanto, considerando que es una proteína altamente conservada, varias de las características funcionales descritas para TcCRT se conservan en distintos grados en la CRT de los vertebrados, incluyendo la molécula humana.

Esta proteína ha sido localizada en el RE, en la membrana celular y fuera del protozoo (Ferreira *et al.*, 2004). En base a su capacidad para unirse a la laminina y para inhibir la proliferación de células endoteliales, tanto HuCRT como TcCRT, han demostrado poseer propiedades antiangiogénicas dosis dependiente *in vitro* e *in vivo* (López *et al.*, 2010).

Por otro lado, el papel de la angiogénesis en la progresión de tumores sólidos ha sido largamente estudiado en una variedad de modelos experimentales. Por ésta razón, un reciente estudio puso a prueba la capacidad de TcCRT y HuCRT para inhibir *in vivo* el crecimiento de un tumor mamario en ratón. El estudio mostró que TcCRT tiene importantes efectos anti-tumorales. En efecto, la molécula del parásito muestra mayores efectos antiangiogénicos que la molécula humana a una misma concentración (López *et al.*, 2010).

Teniendo en consideración lo anterior y dado a que no existen estudios *in vivo* sobre el efecto de CRT en la inducción de tejido de granulación en un ambiente favorable a la producción de hueso, esta Memoria de Título utilizó TcCRT y HuCRT en diferentes dosis, para comprobar su posible efecto estimulante del proceso de fibrosis en lesiones corticales de tejido óseo.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Calreticulinas recombinantes

rTcCRT y rHuCRT fueron proporcionadas por el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM) dirigido por el Dr. Arturo Ferreira (Instituto de Cs. Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

II. Preparación de esponjas de quitosano

Para la preparación de las esponjas se utilizó una solución de quitosano al 2% (20-200 cps, Aldrich), desatilado (86%), en ácido acético (5%), ésta fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente filtrada para eliminar el quitosano no disuelto y las impurezas (Fernández *et al*, 2012). Las esponjas fueron obtenidas agregando a la solución glutaraldehído (0,1% v/v) el que actúa como factor entrecruzante, luego la solución es congelada en nitrógeno líquido y liofilizada. Posteriormente, se realizaron enjuagues sucesivo de la esponja con agua bidestilada con el fin de eliminar el resto de solvente ácido. Finalmente, se liofilizó repetidamente durante 48 horas para obtener un material implantable de quitosano con un trabeculado poroso semejante al de una esponja. La esponja fue cortada en trozos de 0,4 cm con un peso medio de 20 µg cada uno, los que son esterilizados en forma individual con gas de óxido de etileno.

III. Esponja de quitosano cargada con HuCRT y TcCRT

Las esponjas de quitosano fueron utilizadas con el fin de controlar la entrega de CRT dentro la lesión ósea, en una adaptación de lo que se ha utilizado para otras drogas de liberación controlada (Fini y Orienti, 2003). La carga de CRT en cada trozo de esponja se realizó por inmersión de éstos con 40 µl en concentración alta (1,0 µg/µl) o baja (2,5 ng/µl) de rTcCRT o rHuCRT.

IV. Implantación *in vivo* de esponja de quitosano con CRT en ostectomía circular en conejos

Se utilizaron seis conejos blancos neozelandeses machos, de entre dos y tres meses de edad y de 3 a 3,5 kg de peso, los que fueron divididos en tres grupos experimentales (dos conejos por grupo). Los animales fueron inducidos mediante anestesia inhalatoria de Isoflurano al 5% y durante la cirugía se mantuvieron con inhalación de isoflurano al 3 a 3,5 %. Previo a la cirugía, se depilaron las áreas quirúrgicas y fueron desinfectadas con clorexhidina al 2% por 10 minutos. A cada conejo se le realizó una ostectomía circular de húmero, tibia y fémur en ambos miembros utilizando un taladro de alta revolución, equipado con una trefina de 5 mm de diámetro externo. En cada conejo, en los sitios de ostectomía a excepción del fémur derecho que actúa como control negativo, se implantaron los trozos de 0,4 cm² de esponja de quitosano cargada con diferentes concentraciones de rTcCRT o rHuCRT, como lo indica la siguiente tabla:

Tabla 1. Distribución de implantes de quitosano con diferentes concentraciones de rTcCRT o rHuCRT en ostectomía en conejos.

	IZQUIERDO	DERECHO
HÚMERO	rTcCRT (1 µg/µl)	rHuCRT (1µg/µl)
FÉMUR	Sólo esponja	Control negativo
TIBIA	rTcCRT (2,5 ng/µl)	rHuCRT (2,5 ng/µl)

El cierre de cada incisión se realizó con patrón subcutáneo simple discontinuo (4-0 poliglactina 910) y con patrón de piel simple discontinuo (nylon 4-0). Como manejo posquirúrgico, cada conejo recibió ketoprofeno (1mg/kg cada 24 horas) durante tres días, enrofloxacino (5mg/kg cada 24 horas) y tramadol (3 mg/kg cada 24 horas) durante siete días. Los conejos de cada grupo fueron sacrificados a las una, dos y

cuatro semanas post implantación mediante una sobredosis de tiopental sódico vía intravenosa.

Todos los protocolos de estudios en conejos fueron aprobados por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que está en conformidad con los Principios de Guía Internacionales para la Investigación Biomédica en animales elaborado por el Consejo para Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) y con los protocolos de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT), protocolo aprobado N° 3100021.

Los huesos implantados y el control negativo se recuperaron con el tejido circundante y se fijaron en formaldehído 10% durante dos horas. Posteriormente, fueron cortados en secciones de 2 a 3 cm (aproximadamente 0,5 cm por sobre y por debajo del sitio de la lesión) con una sierra diamantada y luego fijados en formaldehído 10% durante una semana. Posteriormente, se lavaron con agua corriente durante dos días y descalcificaron en solución Ana Morse (ácido fórmico 10% y citrato de sodio 5%, en proporción 1:1) (Morse, 1945) durante una semana y para luego ser nuevamente lavados durante dos días. El proceso continúa con la inmersión del material en concentraciones crecientes de etanol y la inclusión en parafina. Finalmente, se realizaron cortes transversales de 5 μ m que fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE) y tinción tricrómica de Mallory Heidenhain para ser examinados por microscopía óptica.

V. Análisis histomorfométrico

Los análisis fueron realizados mediante equipo Nikon modelo Eclipse E-400 y digitalizados mediante cámara Nikon Modelo DS-SMC. Las mediciones cuantitativas se realizaron utilizando el software Nikon Image System Elements Basic Research v3. Se tomaron fotografías (en magnitud de 40x) a sectores adyacente de cada muestra histológica teñida con Mallory Heidenhain, las que luego fueron integradas utilizando el programa Corel® Paint Shop Pro v12 con la finalidad de obtener una

visión completa de la lesión ósea en cada muestra. Posteriormente, se midió la distancia entre ambos extremos óseos, la cual fue expresada en milímetros. Estas mediciones se registraron en una hoja de cálculo Excel para su posterior análisis estadístico.

VI. Análisis estadístico:

Se realizó análisis estadístico para comparar el nuevo hueso formado entre los extremos óseos en los diferentes tratamientos y tiempos de evaluación (una, dos y cuatro semanas), mediante el uso de ANOVA y la prueba de comparación múltiple Tuckey (Zar, 1999). Los análisis estadísticos para todos los experimentos se realizaron utilizando el software Infostat (Córdoba, Ar).

RESULTADOS

CRT inhibe la regeneración ósea

Al analizar las micrografías del **control negativo**, después de 1 semana se observa un cierre parcial de 1,5 mm del defecto óseo (Fig. 1a). Después de 4 semanas de realizada la lesión experimental se observa formación de nuevo tejido óseo llenando el vacío casi por completo (Fig. 1b).

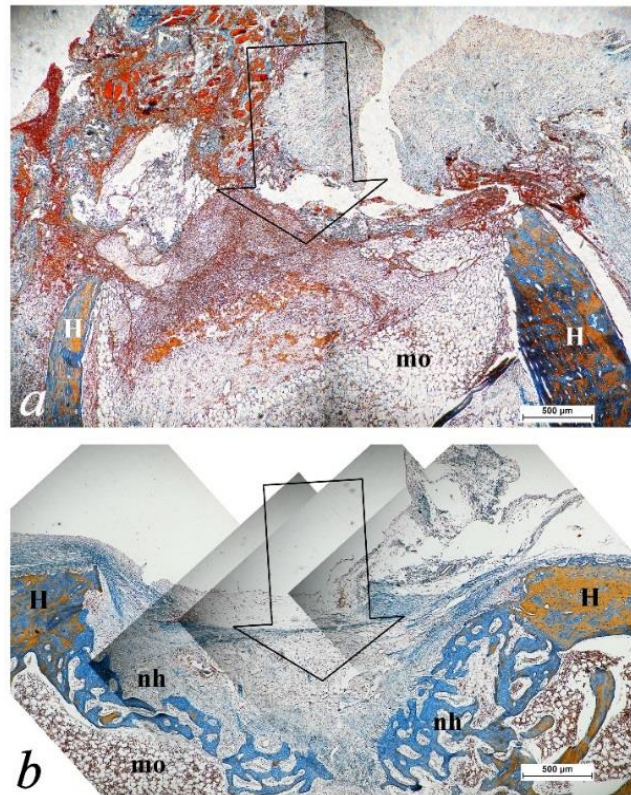


Figura 1. Cierre del defecto óseo evaluado a la primera (a) y cuarta semana (b) de tratamiento. Microfotografías de secciones de hueso de conejo descalcificado y teñido con Mallory (control negativo). Anaranjado (H): hueso maduro; celeste (nh): hueso nuevo; (mo): médula ósea. Las fechas indican el defecto óseo original.

Después de 1 semana en presencia de implante de quitosano embebido con **concentración baja de rHuCRT**, se observa un cierre parcial (1,6 mm) del defecto en el hueso (Fig. 2a). A las 2 semanas, se puede observar un cierre equivalente al 50% ($\pm 2,5$ mm) del defecto óseo (Fig. 2b). A las 4 semanas, se observa una progresiva disminución de la brecha ósea, quedando solo $\pm 2,0$ mm de distancia entre los cabos óseos. (Fig. 2c).

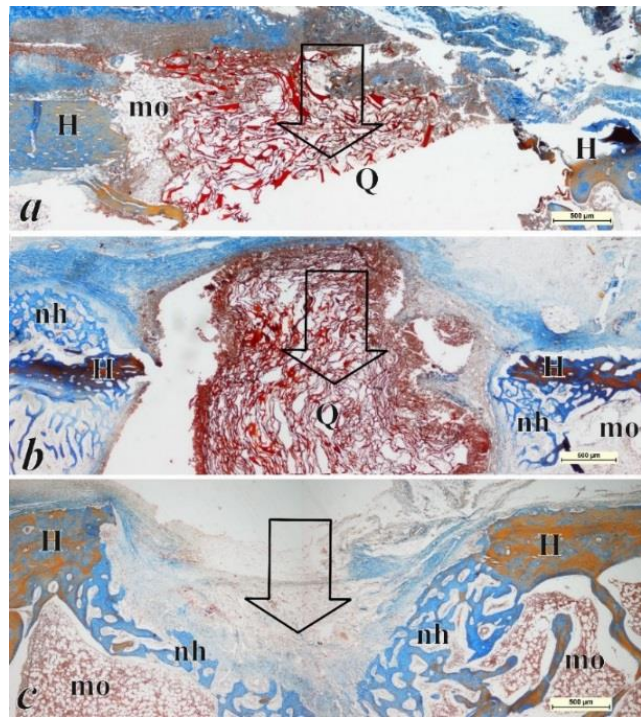


Figura 2. Cierre del defecto óseo evaluado a la primera (a), segunda (b) y cuarta semana (c) de tratamiento en presencia de rHuCRT en baja concentración (2,5 ng/ μ l): Microfotografías de secciones de hueso de conejo descalcificado y teñido con Mallory, el cual fue implantado con quitosano cargado con rHuCRT en baja concentración. Anaranjado (H): hueso maduro; celeste (nh): hueso nuevo; (mo): médula ósea; (Q): esponja de quitosano. Las flechas indican el defecto óseo original.

Después de 1 semana en presencia de implante de quitosano cargado con **concentración alta de rHuCRT**, se puede observar un cierre mínimo (0,4 mm) del defecto en el hueso (Fig. 3a). A las 2 semanas, se puede observar un cierre parcial (1,6 mm) del defecto (Fig. 3b). A las 4 semanas, el defecto no muestra diferencia significativa con la microfotografía de la semana 2 (Fig. 3c).

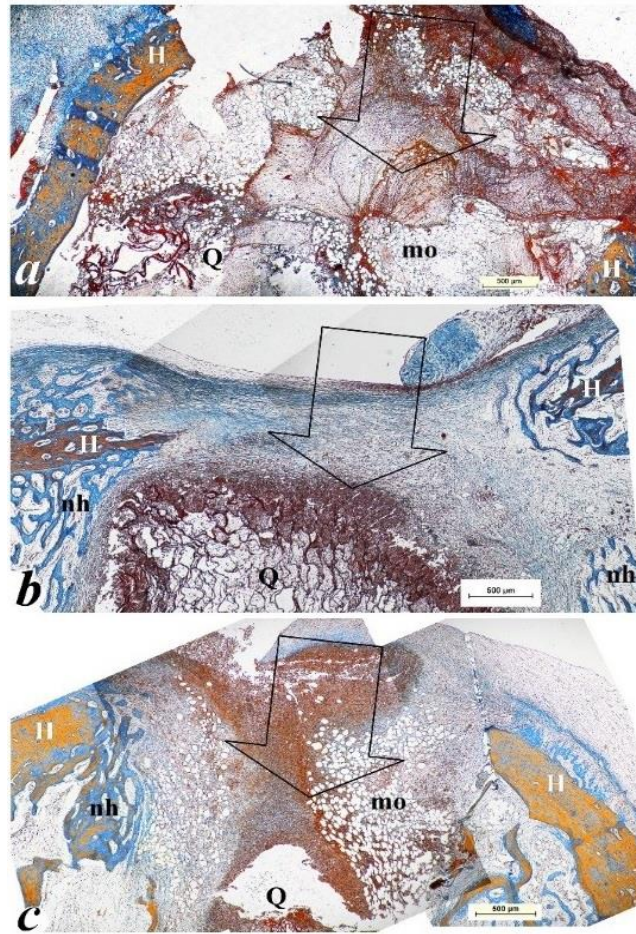


Figura 3. Cierre del defecto óseo evaluado a la primera (a), segunda (b) y cuarta semana (c) de tratamiento en presencia de rHuCRT en alta concentración (1 µg/µl). Microfotografías de secciones de hueso de conejo descalcificado y teñido con Mallory, el cual fué implantado con quitosano cargado con rHuCRT en alta concentración. Anaranjado (H): hueso maduro; celeste (nh): hueso nuevo; (mo): médula ósea; (Q): esponja de quitosano. Las fechas indican el defecto óseo original.

Después de 1 semana en presencia de implante de quitosano cargado con **concentración baja de rTcCRT**, se puede observar un mínimo cierre (0,5 mm) del defecto original en el hueso (Fig. 4a), similar a los resultados obtenidos con concentración alta de rHuCRT. A la semana 2 (Fig. 4b) y 4 (Fig. 4c), se puede evidenciar un cierre similar del defecto de 1,0 mm.

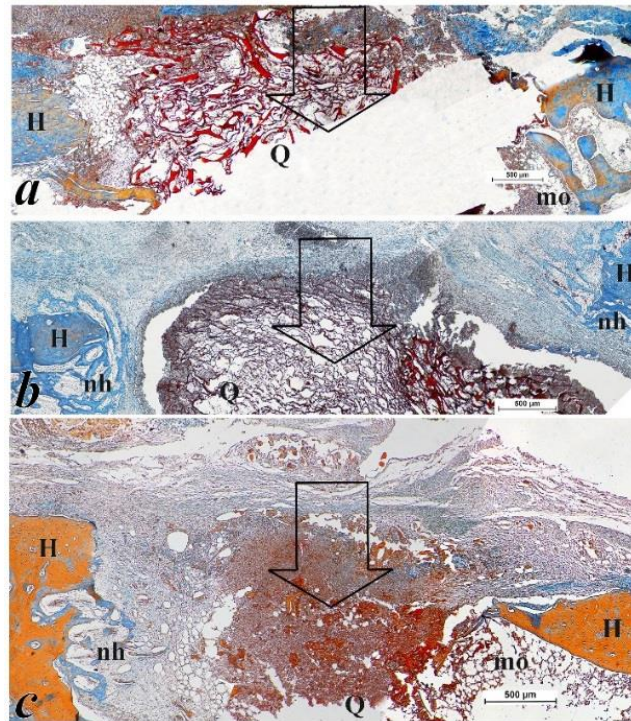


Figura 4. Cierre del defecto óseo evaluado a la primera (a), segunda (b) y cuarta semana (c) de tratamiento en presencia de rTcCRT en baja concentración (2,5 ng/μl). Microfotografías de secciones de hueso de conejo descalcificado y teñido con Mallory, el cual fue implantado con quitosano cargado con rTcCRT en baja concentración. Anaranjado (H): hueso maduro; celeste (nh): hueso nuevo; (mo): médula ósea; (Q) esponja de quitosano. Las fechas indican el defecto óseo original.

Después de 1 semana en presencia de implante de quitosano cargado con **concentración alta de rTcCRT**, no se evidencia cierre del defecto original en el hueso (Fig. 5a). A la semana 2 se observa un cierre mínimo de la lesión ósea (0,6 mm) (Fig. 5b) y a la semana 4 se observa un cierre parcial del defecto óseo (2 mm) (Fig. 5c).

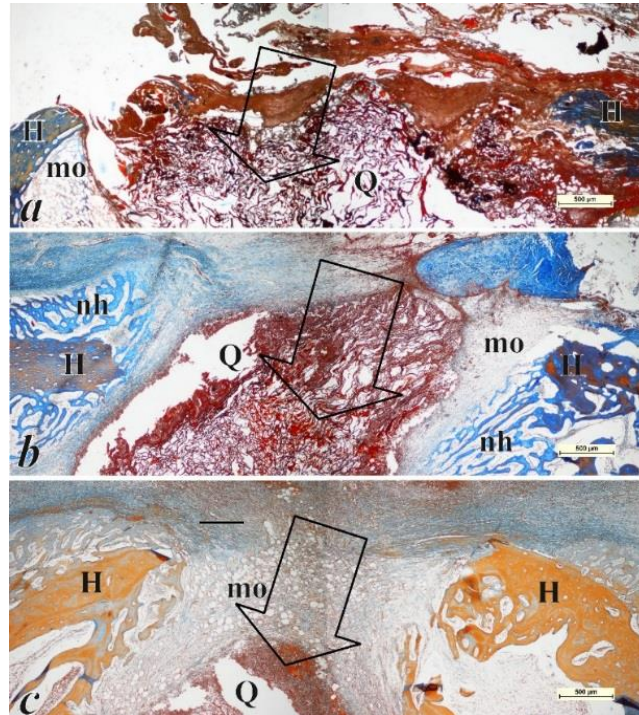


Figura 5. Cierre del defecto óseo evaluado a la primera (a), segunda (b) y cuarta semana (c) de tratamiento en presencia de rTcCRT en alta concentración (1 µg/µl). Microfotografías de secciones de hueso de conejo descalcificado y teñido con Mallory, el cual fue implantado con quitosano cargado con rTcCRT en alta concentración. Anaranjado (H): hueso maduro; celeste (nh): hueso nuevo; (mo): médula ósea; (Q) esponja de quitosano. Las fechas indican el defecto óseo original.

El proceso de regeneración ósea cuando sólo se implanta la esponja de quitosano mostró que, después de 1 semana, un cierre mínimo (0,3 mm) del defecto original (Fig. 6a) era evidente. A las 2 semanas, un cierre parcial (1,7 mm) del defecto se puede observar (Fig. 6b). A las 4 semanas, el defecto muestra una progresiva reducción de la brecha ósea, dejando sólo ± 2 mm de distancia entre los extremos óseos (Fig. 6C).

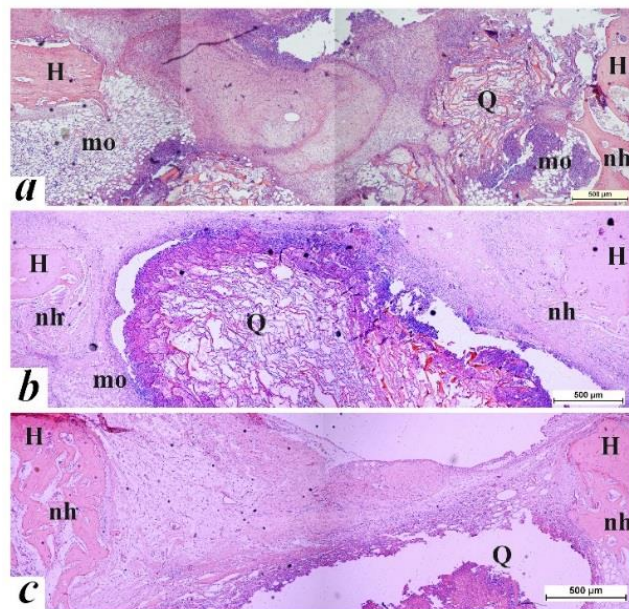


Figura 6. Cierre del defecto óseo evaluado a la primera (a), segunda (b) y cuarta semana (c) de tratamiento en presencia de esponjas de quitosano libres de CRT.

Microfotografías de secciones de hueso de conejo descalcificado y teñido con Mallory, el cual fué implantado con quitosano. Anaranjado (H): hueso maduro; celeste (nh): hueso nuevo; (mo): médula ósea; (Q) esponja de quitosano. Las fechas indican el defecto óseo original.

En la siguiente figura, se muestra que tanto HuCRT como TcCRT, tienen propiedades inhibitoras sobre la regeneración ósea. Sin embargo, TcCRT es más eficiente en esta función.

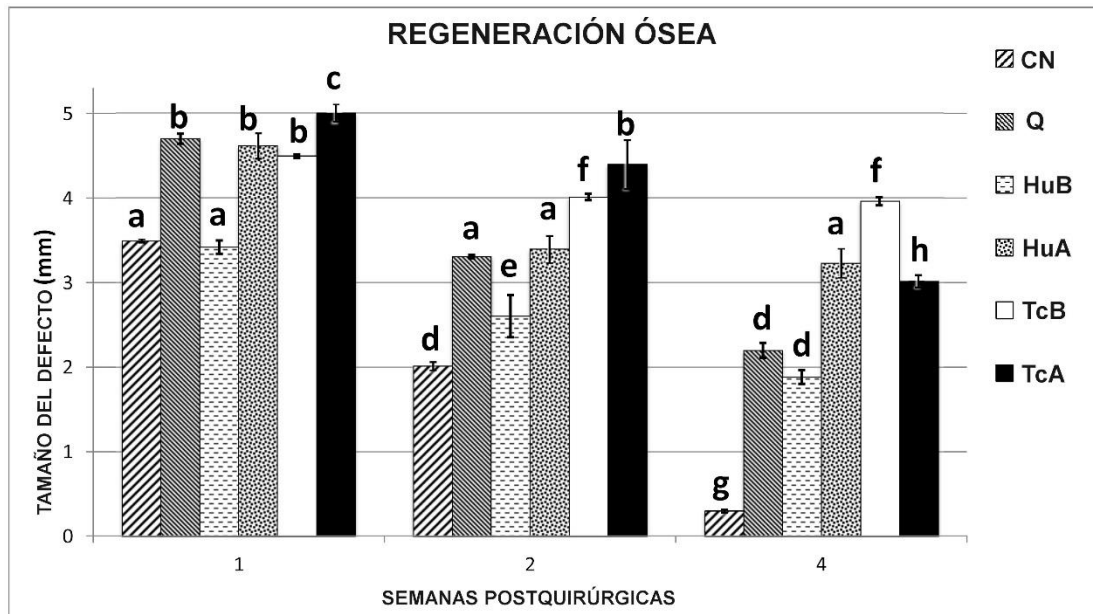


Figura 7. Análisis cuantitativo de la regeneración ósea en conejo, el proceso es modulado por altas concentración de rHuCRT y bajas concentraciones de rTcCRT. (CN): control negativo; (Q) esponja de quitosano sin CRT; (HuB) y (HuA): baja (2,5 ng/μl) y alta (1 μg/μl) concentración de rHuCRT en la esponja de quitosano y (TcB) y (TcA): baja (2,5 ng/μl) y alta (1 μg/μl) concentración de rTcCRT en la esponja de quitosano. Los tiempos experimentales son 1, 2 y 4 semanas después de la cirugía. En cada columna, valores con la misma letra no son significativamente diferentes, como se determina por la prueba de medios al cuadrado ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

La regeneración tisular es la respuesta que consigue la restitución íntegra del tejido tras un trauma, en este sentido el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión (Fernández *et al*, 2006). En ortopedia los esfuerzos se centran mayoritariamente en mejorar el proceso de regeneración ósea, es por ello que la ingeniería de tejidos ha investigado durante años el uso de sustitutos óseos.

El quitosano (cadenas de N-acetilglucosamina), es un derivado deacetilado de la quitina, polímero natural que se encuentra en estructuras de insectos, artrópodos y caparzones de crustáceos, y su capacidad como material biocompatible para diferentes aplicaciones en ingeniería de tejidos ha sido ampliamente demostrada en numerosos estudios durante la última década (Larena *et al*, 2006; Fernández *et al*, 2012). Gracias a las técnicas modernas de procesamiento de polímeros se puede conseguir la manufactura de tejidos con precisión nanométrica que permiten albergar los osteoblastos en su interior permitiendo la entrada de tejidos ajenos y la degradación progresiva del tejido implantado (Larena *et al*, 2006).

Por otro lado, la naturaleza polimérica del quitosano, su capacidad para formar gel y películas, su carácter catiónico, cristalinidad, hidrofiliidad, biodegradabilidad, ausencia de toxicidad, y la posibilidad de la esterilización a alta temperatura, sugiere su uso en la tecnología farmacéutica para el desarrollo de sistemas de suministro de fármacos (Fini y Orienti 2003). Además, el quitosano es altamente biodegradable y se excreta rápidamente en la orina, la droga dispersa en una matriz de quitosano puede ser liberada por erosión/degradación del polímero o también puede ser liberado por difusión de gel (Fini y Orienti 2003). Debido entonces a estas características, la capacidad de retención de agua del quitosano y propiedades bio compatibles (Yazdani-Pedram *et al*, 2003), se utilizó, en esta tesis, como implante óseo el cual fue embebido con CRT humana o parasitaria.

El quitosano al actuar como un dispositivo de suministro lento de fármacos aumenta la eficiencia de CRT permitiendo el uso de dosis más bajas y sin repeticiones de tratamiento como fue necesario realizar en otros estudios (Gold *et al.*, 2010). Este efecto podría explicar los resultados obtenidos sobre la inhibición de la regeneración ósea, como queda demostrado en este experimento.

Si bien el implante de esponja de quitosano tiene un efecto de inhibición de la neoformación ósea por si solo, como queda aquí demostrado, este efecto es menor en comparación con los resultados obtenidos cuando se implanta la esponja embebida con rTcCRT a bajas dosis. A la cuarta semana de tratamiento, el efecto inhibitorio de rTcCRT a bajas dosis sobrepasa aproximadamente en el doble, al efecto solo de la esponja quitosano.

El tamaño crítico de una lesión en huesos de las extremidades de un conejo es de 8 mm, esto quiere decir que es el tamaño más pequeño que no repara espontáneamente (Aaboc *et al.*, 1994). Por lo tanto, si se añade cualquier factor a una lesión ósea unicortical de menos de 8 mm que produce un retraso en la cicatrización ósea, este efecto es causado directamente por el factor implicado. Aunque no se conocen los mecanismos exactos por los que la CRT afecta la diferenciación de osteoblastos, aquí se demuestra, que CRT inhibe la regeneración ósea *in vivo*. Como se muestra en la Figura 7, TcCRT es aproximadamente 400 veces más eficaz que su homólogo humano en retrasar la regeneración ósea.

La vía Wnt (wingless) es una vía de señalización celular implicada en múltiples procesos orgánicos. La participación en el metabolismo óseo ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. Esta vía de señalización intracelular es compleja y está integrada por numerosos componentes (ligandos, receptores de membrana, efectores intracelulares y antagonistas), esta vía modula la diferenciación y la actividad de las células óseas y está implicada en diferentes trastornos esqueléticos (Velasco y Riancho, 2008).

La vía Wnt de señalización intracelular controla la masa ósea y regula la osteoblastogénesis, su actividad y la apoptosis (Bodine *et al.*, 2005). β -catenina, la ruta intracelular de señalización Wnt canónica (Velasco y Riancho, 2008), tanto como factor de transcripción y unido a cadherina, regula la adhesión y la migración celular.

HuCRT solo inhibe la actividad de Wnt *in vitro* de estas células, posiblemente con la participación de varios eventos de fosforilación (Olkku y Mahonen, 2009). Como alternativa o simultáneamente, HuCRT podría, a través de la señalización del calcio, modificar la exportación nuclear y la degradación mediada por calpaina de la β -catenina en el citoplasma (Benetti *et al.*, 2005).

En síntesis, nuestros resultados indican que, y debido a razones aún desconocidas, la molécula TcCRT mostró ser más eficiente en términos equimolares que su contraparte humana (HuCRT) en el retraso de la formación de hueso nuevo en conejos. Sin embargo, se requieren nuevos enfoques experimentales, para poder utilizar CRT con la finalidad de evitar la neo formación ósea y mejorar la formación de tejido fibroso, todo esto con fines ortopédicos. También es necesaria una investigación adicional con el objetivo de mapear la secuencia de aminoácidos de TcCRT y así poder determinar el dominio responsable de estas actividades moduladoras.

REFERENCIAS

- **AABOC, M.; PINHOLT, EM.; HJORTING-HANSEN, E.** 1994. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg.* 5: 201-203.
- **AGUILLÓN, JC.; FERREIRA, L.; PÉREZ, C.; COLOMBO, A.; MOLINA, MC.; WALLACE, A.; SOLARI, A.; CARVALLO, P.; GALINDO, M.; GALANTI, N.; BILLETТА, R.; FERREIRA, A.** 2000. Tc 45 a dimorphic *Trypanosoma cruzi* inmunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *Am J Trop Med Hyg.* 63: 306-312.
- **ARIAS, JI.; CAROLL, S.; BRAVO, P.; HAMILTON-WEST, C.; MALDONADO, I.; FERREIRA, A.** 2012. Comparative effect of human and *Trypanosoma cruzi* calreticulin in wound healing. *J Tissue Eng Regen Med.*
- **ARIAS, JI.; GONZÁLES, A.; FERNÁNDEZ, MS.; GONZÁLES, C.; SAEZ, D.; ARIAS, JL.** 2008. Eggshell membrane as biodegradable bone regeneration inhibitor. *J Tissue Eng Regen Med.* 2: 228-238.
- **BENETTI, R.; COPETTI, T.; DELL'ORSO, S.; MELLONI, E.; BRANCOLINI, C.; MONTE, M.; SCHNEIDER, C.** 2005. The calpain system is involved in the constitutive regulation of b-catenin signaling functions. *J Biol Chem.* 280: 22070–22080.
- **BODINE, PV.; BILLIARD, J.; MORAN, RA.; PONCE DE LEON, H.; MCLARNEY, S.; MAMNGINE, A.; SCRIMO, MJ.; BHAT, RA.; STAUFFER, B.; GREEN, J.; STEIN, GS.; LIAN, JB.; KOMM, BS.** 2005. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J Cell Biochem.* 96: 1212–1230.
- **CHAGAS, C.** 1909. Nova tripanozomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente

etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1:159-218.

- **FERNÁNDEZ, MS.; ARIAS, JI.; MARTÍNEZ, MJ.; SAENZ, L.; NEIRA-CARRILLO, A.; YAZDANI-PEDRAM, M.; ARIAS, JL.** 2012. Evaluation of a multilayered chitosan-hydroxy-apatite porous composite enriched with fibronectin or an in vitro-generated bone-like extracellular matrix on proliferation and differentiation of osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med*.
- **FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, I.; ALOBERA, MA.; DEL CANTO, M.; BLANCO, L.** 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 11: E47-51.
- **FERREIRA, V.; VALCK, C.; SÁNCHEZ, G. GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, MC.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2004. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 172: 3042-3050.
- **FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D.; FERREIRA, A.** 2005. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulina modulate the complement system and angiogenesis?. *Trends Parasitol*. 21: 169-174.
- **FINI, A.; ORIENTI, I.** 2003. The role of chitosan in drug delivery: current and potential applications. *Am J Drug Delivery*. 1: 43-59.
- **GOLD, L.; EGGLETON, P.; SWEETWYNE, M.; VAN-DUYN, L.; MATTHEW, R.; GREIVES, M.; NAYLOR, S-M.; MICHALAK, M.; MURPHY-ULLRICH, J.** 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J*. 24: 665-683.

- **LÓPEZ, N.; VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; RODRÍGUEZ, M.; RIBEIRO, C.; ORELLANA, J.; MALDONADO, I.; ALBINI, A.; ANACONA, D.; LEMUS, D.; AGUILAR, L.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2010. Antiangiogenic and Antitumor Effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *Negl Trop Dis.* 4: 730.

- **MICHALAK, M.; GROENENDYK, J.; SZABO, E.; GOLD, L.; OPAS, M.** 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 417: 651-666.

- **MORSE, A.** 1945. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J Dent Res.* 24: 143-153.

- **NANNEY, L.; WOODRELL, C.; GREIVES, M.; CARDWELL, N.; POLLINS, A.; BANCROFT, T.; CHESSER, A.; MICHALAK, M.; RAHMAN, M.; SIEBERT, J.; GOLD, L.** 2008. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol.* 173: 610-630.

- **NGUYEN, D.; ORGILL, D.; MURPHY, GF.** 2009. The Pathophysiologic Basis for Wound Healing and Cutaneous Regeneration. *Biomaterials for Treating Skin Loss.* p: 25-57.

- **LARENA, A.; TUR, A.; LÓPEZ, F.; FUENTES, A.; DE LA PIEDRA, MC.; MONTERO, M.; BERNAVÉU, E.** 2006. Aproximación nanotecnológica a la regeneración ósea. Evaluación química y biológica del quitosano como material en ingeniería tisular ósea. *Patología del Aparato Locomotor.* 4 (3): 208-214.

- **OLKKU, A.; MAHONEN, A. 2009.** Calreticulin mediated glucocorticoid receptor export is involved in β -catenin traslocation and wnt signalling inhibition in human osteoblastic cells. *Bone*. 44 (4): 555-565.

- **OSTWALD, T.J.; MACLENNAN, DH. 1974.** Isolation of a high-affinity calcium-binding protein for sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 249: 974-979.

- **RAMÍREZ, G.; VALCK, C.; FERREIRA, V.; LÓPEZ, N.; FERREIRA, A. 2011.** Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host-parasite interplay. *Trends Parasitol*. 27: 115-122.

- **RAMOS, R.; JURI, M.; RAMOS, A.; HOECKER, G.; PENA, P.; REPETTO, Y.; AGUILLÓN, JC.; FERREIRA, A. 1991.** Immunogenetically defined and immunedominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am J Trop Med Hyg*. 44: 314-322.

- **TOLEDO, V.; RAMÍREZ, G., LÓPEZ, N.; RIBEIRO, CH.; MALDONADO, I.; AGUILAR, L.; LEMUS, D.; FERREIRA, A. 2010.** Comparative *in vivo* antiangiogenic effects of calreticulin from *Trypanosoma cruzi* and *Homo sapiens sapiens*. *Biol Res*. 43: 287-289.

- **VELASCO, J.; RIANCHO, J.A. 2008.** La vía WNT y el hueso. *REEMO*. 17(1): 5-9.

- **YAZDANI-PEDRAM, M.; TAPIA, C.; RETUERT, J.; ARIAS, JL. 2003.** Synthesis and unusual swelling behavior of combined cationic/ non-ionic hidrogels base don chitosan. *Macromol Biosci*. 3: 577-581.

- **ZAR, JH. 1999.** Biostatistical Analysis. Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ.