



**Universidad de Chile
Facultad de Odontología
Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
Laboratorio de Biología Celular y Molecular**

**Influencia de la proteína salival Histatina-1 en la migración y adhesión de
células endoteliales**

Pedro Torres Salazar

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Vicente Torres Gómez**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1140907
Santiago - Chile
2018**



**Universidad de Chile
Facultad de Odontología
Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
Laboratorio de Biología Celular y Molecular**

**Influencia de la proteína salival Histatina-1 en la migración y adhesión de
células endoteliales**

Pedro Torres Salazar

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Vicente Torres Gómez

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1140907
Santiago - Chile
2018**

Agradecimientos

La verdad es que hay mucho que agradecer, y una plana no hace real justicia. Además, se me hace tremendamente difícil expresar en palabras las emociones y sentimientos que quiero plasmar en esta plana, a veces sale más fácil dar un buen abrazo. En fin, trataré de ser lo menos latero y empalagoso, aunque pensándolo bien, ¿No qué para eso es la página de agradecimientos?

Mucho tengo que agradecer a mi madre y padre, a Carlos y a mi tía Rosa. Su continuo apoyo y guía han sido una piedra angular. Quizás no lo diga, pero ustedes son un ejemplo por seguir. Puta que los quiero.

A mis hermanos Angelica, Christopher y Emilia, y mi prima Estefanía. Es verdad, nos agarramos a coscachos, sin embargo, hablar y bromear con ustedes me alegra.

Anita, apañando desde kínder, has sido una excelente amiga. Camila, nunca nos vemos, pero cuando nos vemos, la amistad sigue intacta. Franco, Froilán, Rodrigo, Fabian y Manuel, siempre se corretean, pero cuando nos vemos, recuerdo porque los quiero.

Javi, Cristian, Pala, Nacho y Mane, me siento apoyado y querido en nuestro Centro de Madres, con sede en el Telepollo. Por favor, no nos movamos de ahí.

Choclón, Negros, Safi, Coni D, Fran, Clau. Ustedes saben que los quiero caleta y cuentan conmigo (sino lo sabían, ahora sí), sin embargo, no me pondré a explayarme en cada uno de ustedes, o sino esto se haría interminable.

Agradezco profundamente a Vicente por su inmenso apoyo y confianza, tanto en lo personal como en el laboratorio. Hay que dar merito al hombre, dejó entrar a un mono con navaja (yo) a su laboratorio. Aquel hecho me permitió conocer a maravillosas personas, como Pato, Pablo, Jorge, Sole, Ceci, Montse, Luis y Seba. Todos ustedes hacen que el ambiente en el laboratorio sea agradable.

Feña, gracias por tu apoyo, cariño y afecto. Gracias por compartir tu tiempo conmigo, no sabes cuánto lo valoro y disfruto. PD: ¿Se nota que me gustas?

Se me olvidaba, gracias a ti aprobé Odontopediatría (aunque siendo justos, Nayib también ayudó)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice_____	1 - 2
Resumen_____	3
Marco teórico_____	4 - 18
Bases biológicas de la reparación de heridas.....	4 - 7
Reparación de heridas en mucosa oral.....	8 - 9
Rol de la saliva en la reparación de heridas orales.....	10
Histatinas y su rol en la fisiología oral.....	11 - 14
Mecanismos celulares y moleculares de la angiogénesis en reparación de heridas.....	15 - 16
VEGF y su presencia en saliva.....	17
Resumen de antecedentes.....	18
Hipótesis_____	19
Objetivo general_____	19
Objetivos específicos_____	19
Metodología_____	20 - 30
Tipo de estudio.....	20
Materiales.....	20 - 21
Sujetos de estudio.....	21
Metodología experimental.....	22 - 29
Cultivo celular-----	22
Síntesis de Histatina-1-----	22
Ensayo de Western blot-----	22
Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	23
Ensayo de cierre de heridas en línea celular OKF6/Tert2	23
Ensayo de cierre de heridas en línea celular EA.hy926	24
Ensayo de trans migración en cámara Boyden en línea celular EA.hy926-----	24
Ensayo de adhesión en línea celular EA.hy926-----	25

Ensayo de expansión (<i>spreading</i>) en línea celular EA.hy926	25
Video-microscopía de células EA.hy926-----	25
Ensayo de proliferación en línea celular EA.hy926-----	26
Ensayo de formación de redes vasculares <i>in-vitro</i> -----	26
Inmunodepleción de Histatina-1 de saliva total-----	27
Ensayo de precipitación por afinidad de Rab5-GTP y Rac1-GTP-----	28
Transfección transitoria-----	28 - 29
Ensayo de inmuno-fluorescencia-----	29
Ensayo de detección de proteínas ERK y FAK-----	29 - 30
Análisis estadístico.....	30
Resultados_____	31 - 49
Síntesis de Histatina-1 y validación actividad biológica.....	31 - 33
Histatina-1 y su efecto en la migración y adhesión endotelial.....	34 - 37
Histatina-1 y su efecto en la proliferación endotelial.....	38
Histatina-1 y su efecto en la conformación estructural endotelial.....	39 - 40
Saliva humana y su relación con células endoteliales.....	41 - 43
Histatina-1 y vías de señalización en células endoteliales.....	44 - 49
Discusión_____	50 - 56
Conclusión_____	57
Referencias bibliográficas_____	58 - 65
Anexos_____	66 - 76

RESUMEN

Introducción: La saliva es un fluido oral rico en factores que han sido asociados con la reparación de heridas en mucosa oral. Histatina-1 es un péptido pequeño, considerado como uno de los principales factores salivales que contribuyen a la re-epitelialización de heridas. Sin embargo, su participación en otras fases de la reparación de heridas, como la angiogénesis, no ha sido establecida. En este trabajo investigamos el efecto de Histatina-1 salival y sintética sobre la adhesión y migración de células endoteliales, así como en el potencial angiogénico de células endoteliales, y la activación del eje de señalización RIN2/Rab5/Rac1.

Materiales y métodos: Se usó la línea celular EA.hy 926, y el cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano, HUVEC. La migración celular fue evaluada en ensayos de cierre de heridas y de transmigración en Cámara Boyden. La adhesión celular sobre matriz de fibronectina fue determinada por tinción con cristal violeta, y mediante video-microscopía de células vivas. Los niveles de Rab5-GTP y Rac1-GTP fueron evaluados por medio de ensayos de precipitación por afinidad (*pull-down*). La participación de las proteínas de señalización RIN2, Rab5 y Rac1, fue evaluada por inmunofluorescencia y microscopía confocal, ensayos de migración en Cámara Boyden y en experimentos de transfección con las mutantes inactivas de Rab5 y Rac1, GFP-Rab5/S34N y GFP-Rac1/T17N, respectivamente. La morfogénesis vascular fue valorada por medio de ensayo de formación de capilares *in vitro*. Finalmente, la relevancia de Histatina-1 salival en la migración endotelial fue evaluada por medio de una inmunodepleción de Histatina-1 salival.

Resultados: Los resultados expuestos en este trabajo indican que Histatina-1 promueve la adhesión y migración de células endoteliales a través del eje RIN2/Rab5/Rac1, y más aún, que Histatina-1 actúa como un factor promotor de la morfogénesis vascular *in vitro*. Finalmente, observamos que la saliva humana por medio de Histatina-1, es capaz de promover la migración celular endotelial.

Conclusión: Estos resultados establecen a Histatina-1 como un nuevo factor pro-angiogénico. Lo anterior, sumado a estudios previos, permitiría proyectar a Histatina-1 como un posible coadyuvante en el tratamiento de patologías con alteración en la reparación de heridas.

MARCO TEÓRICO

I.- Bases biológicas de la reparación de heridas

El cuerpo humano normalmente se encuentra expuesto a injurias del medioambiente, las cuales pueden repercutir en la pérdida de integridad del tejido afectado. Frente a esto, es que el cuerpo desencadena una serie de eventos que en su conjunto buscan la reparación de la herida por medio del reemplazo del tejido dañado, recuperando así la estructura y función tisular (Orsted y col. 2011).

La reparación de heridas se sustenta sobre cuatro eventos principales distintos, pero interrelacionados, los cuales han de tener una secuencia temporal correcta, en conjunto con una duración específica y óptima intensidad (Guon y DiPietro 2010). Estos eventos o etapas son los siguientes (**Figura 1**):

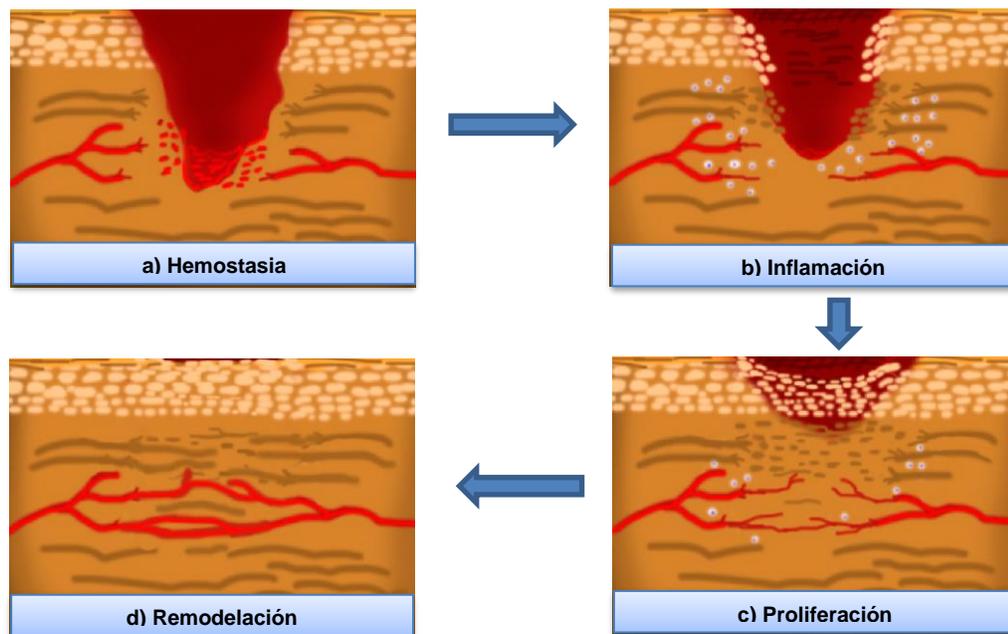


Figura 1| Fases de la reparación de heridas. A) Posterior a una herida el primer objetivo es limitar la pérdida sanguínea y ofrecer una matriz provisoria (coágulo sanguíneo) para las siguientes etapas. B) Inmediatamente se inicia la migración de células del sistema inmune que limpiarán el sitio de patógenos oportunistas y elementos tisulares dañados. C) Una vez activadas las células residentes, estas comienzan a migrar, proliferar y secretar matriz extracelular, para llevar al sellado definitivo de la herida. D) Ya sellada la herida, comienza la remodelación del sitio que permitirá el recuperar la funcionalidad del tejido lesionado (modificado de Torres y col. 2017a).

A. Hemostasia:

La hemostasia es el proceso fisiológico por el cual el cuerpo busca limitar la pérdida sanguínea de los vasos, permitiendo la perfusión tisular y el proceso de reparación local (Dahlback 2005). Frente a una injuria que conlleve daño vascular, comienza el proceso hemostático por medio de la vasoconstricción refleja de los vasos dañados. A su vez se inicia la activación de las plaquetas, las cuales bloquearán las brechas del vaso sanguíneo, actuando como un tapón. De manera simultánea se lleva a cabo la activación de la cascada de coagulación, lo cual conlleva a la conversión del fibrinógeno en fibrina, y posterior polimerización de la fibrina, proceso que culmina con la formación del coágulo sanguíneo (Versteeg y col. 2013).

La importancia de la hemostasia en la reparación de heridas radica en la activación de las plaquetas, las que liberan un conjunto de citoquinas, como el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales actúan como agentes quimiotácticos para células del sistema inmune, células endoteliales y fibroblastos, los cuales serán necesarios para las siguientes etapas. Además, el coágulo formado en esta etapa actúa como matriz extracelular provisoria, y como reservorio de factores de crecimiento, destacando el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) (Laurens y col 2006).

B. Inflamación:

Inmediatamente después de la injuria, células residentes, como los mastocitos, son activados e inician la respuesta inflamatoria (Shaw y Martin 2009). La activación de mastocitos es acompañada de la liberación de gránulos con elementos proinflamatorios y vasodilatadores, facilitando la llegada de elementos celulares inmunitarios (Puxeddu y col. 2003). Entre las primeras células inmunes que llegan al sitio, se encuentran los neutrófilos, los cuales comienzan con la limpieza del sitio dañado, por medio de la fagocitosis de patógenos oportunistas y elementos celulares dañados (Broughton y col. 2006). Por otro lado, además de neutrófilos, comienza la llegada de macrófagos, los cuales tienen un rol fundamental en la regulación de la inflamación. Esta regulación es fundamental, ya que una

respuesta inflamatoria exacerbada conlleva a una reparación retrasada, y la presencia de cicatrices hipertróficas (Shaw y Martin 2009). Por lo tanto, debe existir una respuesta inflamatoria mínima y controlada, que asegure la limpieza del sitio afectado (Szpaderska y col. 2003).

C. Proliferación:

Esta fase es caracterizada por la proliferación y migración de distintos tipos celulares, y tiene como objetivo principal el cierre definitivo de la herida. La fase proliferativa se sustenta en 3 eventos principales: re-epitelialización, formación de tejido de granulación y angiogénesis (Hannu Larjava, Oral Wound Healing, Primera Edición, 2012).

La re-epitelialización conlleva al re-establecimiento de la barrera epitelial, por medio de la migración y proliferación de los queratinocitos que se encuentran en el borde de la herida (Turabelidze y col. 2014). Este proceso es de gran importancia, puesto que fallas en la re-epitelialización, sea incompleta o incorrecta, están asociadas a cronificación y persistencia de heridas (Richard y col. 1996; Usui y col. 2008). Dado lo anterior, es que, una vez ocurrido el trauma sobre esta barrera, los queratinocitos adyacentes a la herida se activan inmediatamente (Larjava y col. 1993), disolviendo tanto sus contactos hemidesmosomales con la membrana basal, como sus uniones intercelulares (Beaudry y col. 2010). Posterior a su activación, los queratinocitos comienzan a migrar sobre la matriz extracelular provisoria. Una vez que los frentes epiteliales se han unido y la herida es cubierta, la migración celular culmina debido a inhibición por contacto celular, y a su vez, se da inicio a la generación de la membrana basal subyacente en múltiples sitios (Larjava y col. 1993). En esta etapa, los queratinocitos comienzan a proliferar y a diferenciarse para así poner término a la re-epitelialización (Garlick y col. 1996).

La formación de tejido de granulación lleva al reemplazo de la matriz extracelular provisoria (dada por el coágulo), por un tejido conectivo inmaduro y desordenado, secretado por fibroblastos residentes en el sitio dañado (Shaw y Martin 2009). En este punto, los fibroblastos cercanos a la herida son activados de diferentes maneras, entre ellas, por su exposición a factores de crecimiento liberados en el sitio de la herida, y por contacto a una matriz extracelular diferente (coágulo rico en

fibrina y fibronectina) (Barrientos y col. 2008). Una vez activados, los fibroblastos migran a través de la matriz extracelular provisoria y comienzan su proliferación y la síntesis de matriz extracelular (Hannu Larjava, Oral Wound Healing, 1° edición, 2012). Ya establecido el tejido de granulación, una parte de la población de fibroblastos comienzan su diferenciación a miofibroblastos, los cuales participan en la contracción de la herida, acercando los bordes de ésta (Gurtner y col. 2008).

La angiogénesis corresponde, en otras palabras, a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes. Lo anterior sustenta la reparación de heridas por medio de la llegada de nutrientes, oxígeno y elementos celulares al sitio dañado (Carmeliet 2003). Cabe destacar que los fenómenos que componen la etapa de proliferación interactúan mutuamente y tienen un inicio simultáneo (Guon y Di Pietro 2010).

D. Remodelación:

Esta etapa puede tomar desde meses a años, dependiendo del tamaño de la herida. Su principal objetivo es la maduración y reordenamiento de la matriz extracelular secretada en la fase de proliferación. El resultado final de la fase de remodelación depende de la duración de la respuesta inflamatoria, el desarrollo de la infección y la calidad del tejido de granulación formado previamente (Hannu Larjava, Oral Wound Healing, 1° edición, 2012).

II.- Reparación de heridas en mucosa oral

El proceso de reparación de heridas involucra las mismas etapas en los tejidos blandos, como por ejemplo en piel y mucosa oral (Sciubba y col. 1978 – Walsh y col. 1996), de tal manera que sería razonable pensar que este proceso fuese equivalente y con eficiencias similares en ambos tejidos. Sin embargo, desde hace décadas se sabe que la reparación de heridas en mucosa oral es más rápida, eficiente e involucra una menor presencia de inflamación y cicatrices (Hennicke 1950). Lo anterior ha sido sustentado, no tan sólo en modelos experimentales murinos, comparando incisiones realizadas en mucosa palatina y en piel dorsal (Sciubba y col. 1978; Spaderska y col. 2003), sino además usando modelos porcinos, específicamente analizando incisiones en mucosa palatina y piel dorsal en Cerdos *Duroc* (Figura 2), y por último en humanos, analizando incisiones en mucosa palatina (Wong y col. 2009).

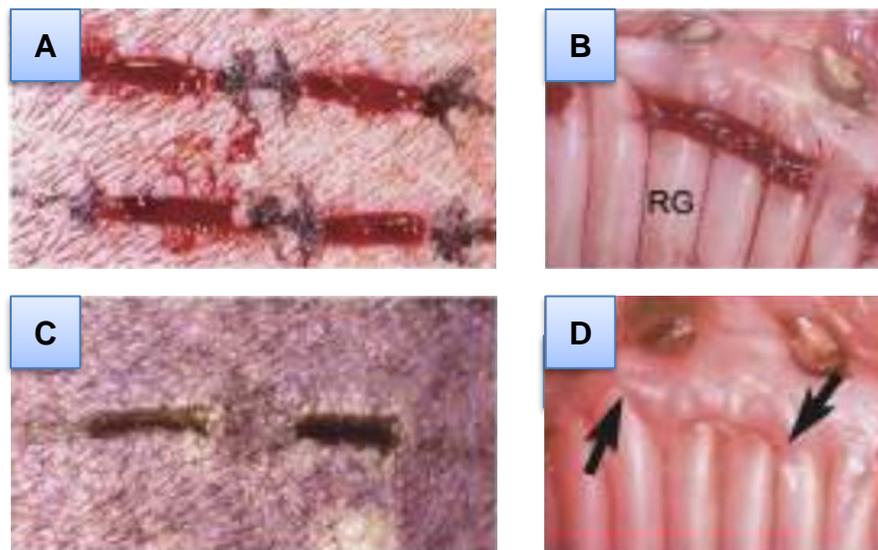


Figura 2 | Diferencias de reparación entre piel y mucosa oral. A) y B) Imágenes de heridas estandarizadas (día 0) realizadas en piel dorsal y mucosa palatina, respectivamente. C) y D) Imágenes de heridas al día 7 de realizadas, en piel dorsal y mucosa palatina respectivamente. Como se puede ver, existe una diferencia en la rapidez con la que se lleva a cabo la reparación de heridas entre la piel y la mucosa oral. En este caso se utilizaron cerdos *Red Duroc* como modelo experimental. (Modificado de Wong y col. 2009).

Los estudios anteriormente citados ponen en evidencia que hay una diferencia en la velocidad de reparación entre piel y mucosa oral, por lo que es relevante comprender los mecanismos subyacentes a aquellas diferencias. Al respecto, se ha propuesto que factores, tanto intrínsecos y propios de la arquitectura de la mucosa oral, como extrínsecos y factores ambientales, contribuyen a estas diferencias. Entre los factores intrínsecos, se ha demostrado que los queratinocitos orales migran con mayor rapidez y proliferan más rápidamente que los queratinocitos de piel (Drukala y col. 2005 - Turabelidze y col. 2014). Además, los queratinocitos orales poseen una mayor reserva de glicógeno y ácido palmítico que los queratinocitos de piel, lo cual indicaría que son metabólicamente más activos (Kuroki y col. 2009). A lo anterior se suman diferencias importantes a nivel de los fibroblastos orales y específicamente gingivales, en relación a los fibroblastos de piel, donde destaca una mayor capacidad proliferativa, contráctil y una producción incrementada de elementos mitógenos (Glim y col. 2013).

Por otro lado, los factores ambientales y locales también contribuyen a la reparación más eficiente en heridas orales, entre ellos la respuesta inflamatoria leve en mucosa oral versus piel, según se ha evidenciado en modelos de incisión en ratas (Szpadarska y col. 2003) y cerdos Duroc (Mak y col. 2009), y la alta vascularización a nivel de mucosa oral (Cannady y col. 1993). Un factor importante por considerar en este contexto es la presencia de saliva en la cavidad oral, la cual no tan sólo cumple un rol masticatorio y digestivo, sino además en la mantención de la integridad en la mucosa oral (Brand y col. 2014).

III.- Rol de la saliva en la reparación de heridas orales

La saliva es un fluido biológico procedente de las secreciones de glándulas salivales mayores, menores y el fluido gingival crevicular (surco gingivo-dentario), las cuales al ser excretadas a la cavidad oral se mezclan, y constituyen la saliva, también denominada saliva total. Sus funciones pueden ser divididas en 3 ejes principales: procesamiento de alimentos, función regulatoria y función protectora. Dentro de esta última función destaca la capacidad de la saliva de fomentar la reparación de heridas en la mucosa oral (María Elsa Gómez de Ferraris. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental, 3° edición, 2009; Brand y col. 2014; Glim y col 2013).

El rol de la saliva en la reparación de heridas ha sido demostrado principalmente en modelos animales, en donde ratones desalivados presentan alteraciones y disminución en la reparación de heridas en el paladar (Bodner y col. 1992; Bodner y col. 1993). A lo anterior se suma la respuesta acelerada en la reparación de heridas en piel de ratones, cuando estos aplican saliva al lamer sus heridas (Hutson y col. 1979). Estas observaciones son además sustentadas por el antecedente de que pacientes con diagnóstico de Síndrome de Sjogren's destacan por tener una mucosa oral más frágil, la cual requiere de más tiempo para reparar frente a una injuria y la persistencia de ulceraciones prolongadas (Mathews y col. 2008).

Entre los mecanismos asociados a estas propiedades de la saliva, se ha descrito el propio ambiente húmedo que proporciona, evitando la desecación celular (Winter y Scales 1963), mientras que por otro lado se ha destacado la presencia de una gran variedad de factores solubles en saliva, los que juegan un rol importante en las diferentes etapas de la reparación de heridas (Brand y col. 2014). Entre estos factores solubles, destaca un conjunto de péptidos de bajo peso molecular, conocidos como Histatinas.

IV.- Histatinas y su rol en la fisiología oral

Las Histatinas son un grupo de proteínas ricas en histidina, cuyo tamaño no supera los 38 aminoácidos (**Figura 3**), y que han sido estudiadas principalmente por su acción antifúngica (Oppenheim y col. 1988). Se expresan exclusivamente en la saliva de humanos y primates superiores (Padovan y col. 2010), aunque estudios más recientes han documentado su expresión también en epitelio lacrimal humano (Shah y col. 2016). Dentro de esta familia de proteínas, Histatina-1 e Histatina-3 son productos de los genes *HIS1* e *HIS2* (también conocidos como *htn1* y *htn3*), respectivamente (vanderSpek y col. 1989; Sabatini y col. 1989; Azen y col. 1973). Las otras Histatinas de este grupo de proteínas (es decir, Histatina-2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11 y -12) son productos de proteólisis a partir de Histatina-1 e Histatina-3 (Sabatini y Azen 1989; vanDerspek y col. 1989; Troxler y col. 1990; Xu y col. 1992; Messana y col. 2008; Messana y col. 2015). Particularmente, por su acción antimicrobiana, se ha descrito más detalle sobre el mecanismo de producción de Histatina-5, la cual se origina por proteólisis de Histatina-3 a nivel intracelular (Messana y col. 2008), mientras que la Histatina-2 es también generada por ruptura proteolítica, pero en este caso, a partir de Histatina-1, una vez que ésta ya ha sido secretada hacia la saliva (Xu y col. 1992).

Como se mencionó anteriormente, las Histatinas han sido estudiadas principalmente en el contexto de acción antifúngica, función que es llevada a cabo principalmente por las Histatinas -3 y -5 (Melino y col. 2014). Lo anterior no quiere decir que Histatina-1 no posea actividad antifúngica, sino que tiene menos potencia en relación a sus homólogas, situación que ha sido asociada a diferencias estructurales y en su secuencia aminoacídica (Oudhoff y col. 2008) (**Figura 3**). Por otro lado, Histatina-1 presenta una modificación post-traduccional única dentro de este grupo de proteínas, correspondiente a una fosforilación en Serina2 (Oppenheim y col. 1986). En consecuencia, y por sus características estructurales únicas, Histatina-1 ha sido principalmente asociada a la generación de la película salival adquirida del esmalte, y por lo tanto, a la mantención de la integridad del esmalte dental (Vitorino y col. 2005). Lo anterior cobra relevancia al analizar pacientes con diagnóstico de caries temprana de la infancia, quienes

posteriormente al tratamiento, presentaron un aumento en la concentración de Histatina-1 en saliva total (Sun y col. 2016).



Figura 3 | Secuencia de aminoácidos de los principales constituyentes del grupo de las Histatinas. Como se puede ver, estas proteínas son ricas en el aminoácido histidina. Además, Histatina-1 es la única proteína que presenta un grupo fosfato, en el aminoácido Ser-2, característica que favorecería su función en la formación de la película salival adquirida. (Modificado de Torres y col. 2017a)

Histatina-1 es un péptido de 38 aminoácidos, sintetizado y secretado por los acinos serosos presentes en las glándulas parótida, submandibular, sublingual y de von Ebner (Sabatini y Azen 1989; vanDerspek y col. 1989; Azen y col. 1990; Takano y col. 1993; Ahmad y col. 2004; Piludu y col. 2006), aunque estudios recientes la han detectado también en epitelio lacrimal humano (Shah y col. 2016) y en lesiones metastásicas de pacientes con diagnóstico de melanoma (Yagushi y Kawakami 2010). Una vez secretada hacia la cavidad oral, Histatina-1 se acumula en la saliva, donde sus concentraciones fluctúan entre 5µM y 15µM, dependiendo del ciclo circadiano (Castagnola y col. 2002), las enzimas proteolíticas presentes en la saliva (Sun y col. 2009; Campese y col. 2009) y su adsorción en la película salival adquirida (Siqueira y col. 2010).

Además de las funciones que cumple Histatina-1 en la generación de la película salival adquirida y en su acción antifúngica, estudios más recientes han indicado que Histatina-1 es un factor que promueve la migración y adhesión de queratinocitos orales (Oudhoff y col. 2008) y fibroblastos gingivales (Oudhoff y col.

2009a). Algo más intrigante aún, es el hallazgo de que los efectos de Histatina-1 no son restringidos a células derivadas de la cavidad oral, sino además a células humanas no orales, como queratinocitos de piel, fibroblastos dermales y células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de pulmón (Oudhoff y col. 2009a; Oudhoff y col. 2009b), así como también en células de otras especies, como células de epitelio canino y pre-osteoblastos de ratón (vanDijk y col. 2017a). Esta novedosa habilidad pro-migratoria de Histatina-1 sobre los queratinocitos (orales y no orales) sugiere la relevancia de este péptido en la fase de re-epitelialización de la reparación de heridas. Lo anterior se sustenta en un estudio realizado el año 2009 por Oudhoff y col.^a, quienes, mediante ingeniería tisular, generaron un tejido sintético de “tipo epidermis”, al cual se le realizaron heridas para medir su respuesta reparativa frente a injuria *in vitro* (**Figura 4**). Así se demostró que el epitelio sintético expuesto a Histatina-1 presenta un cierre de herida más rápido y eficiente, con respecto a su contraparte control no expuesto. Este hallazgo ha llevado a proponer a la Histatina-1 como un factor clave en la saliva que contribuye a la fase de re-epitelialización de la reparación de heridas en mucosa oral. No obstante, la posible participación de Histatina-1 en otras fases de la reparación de heridas no ha sido investigada.

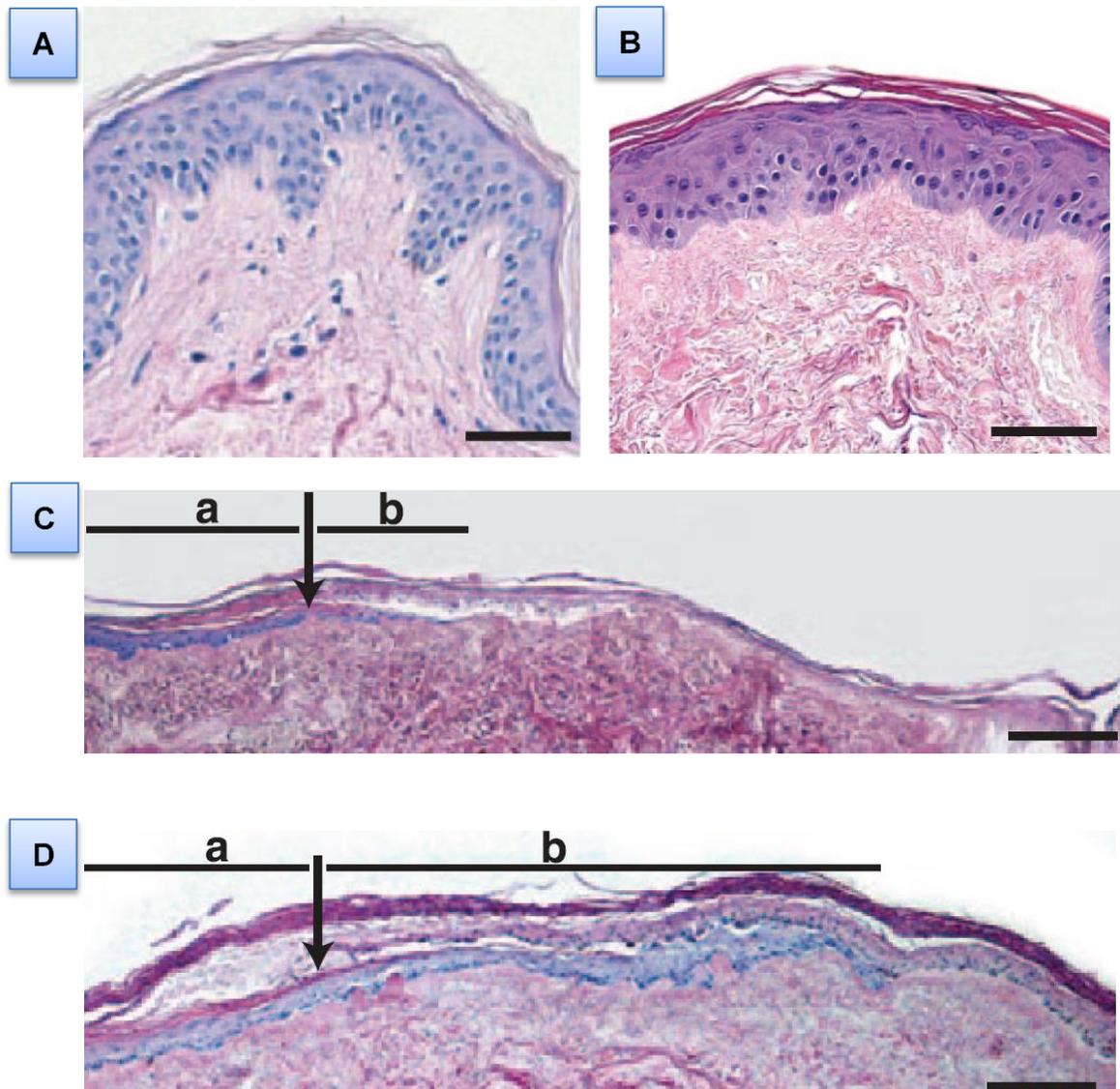


Figura 4 | Efecto *In vitro* de Histatina-1 en la re-epitelialización de heridas: A) Corte histológico de piel humana. B) Corte histológico de tejido epidermal obtenido por ingeniería tisular, nótese la similitud entre A) y B). C) y D) Imágenes a los 6 días, de tejidos sometidos a una herida (herida realizada desde la flecha hacia la derecha). En C) el tejido fue tratado con el enantiomero D-Histatina-1 (forma sin efecto pro-migratorio (Oudhoff y col. 2008), y en D) el tejido fue tratado con Histatina-1. La línea "b" representa la porción re-epitelializada de la herida. Todos los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. (Modificado de Oudhoff y col. 2009a).

V.- Mecanismos celulares y moleculares de la angiogénesis en reparación de heridas

Como se mencionó anteriormente, la angiogénesis es un proceso crucial durante la reparación de heridas, así como también en el contexto de otros eventos, tanto fisiológicos como patológicos (Carmeliet 2003). La angiogénesis se inicia con la vasodilatación y la salida de proteínas plasmáticas, las cuales actúan como proteínas de andamio (Bryan y D'Amore 2007), eventos que preceden la degradación localizada de la membrana basal por parte de las células endoteliales, gracias a la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP) (Carmeliet 2000). Una vez situadas sobre la matriz extracelular, las células endoteliales establecen un frente de avance hacia donde proliferan y migran para establecer contactos con vasos sanguíneos adyacentes. Cuando se establecen las nuevas uniones entre células endoteliales, comienza la formación del lumen del vaso sanguíneo, y si corresponde, la maduración del vaso sanguíneo por medio de la aposición de células perivasculares (Carmeliet 2000) (**Figura 5**). Este proceso es coordinado por un conjunto de citoquinas, enzimas proteolíticas y factores de crecimiento, dentro de los cuales destaca el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Eming y col 2007). Se sabe que VEGF es capaz de activar un conjunto de vías de señalización intracelular en células endoteliales, las cuales serían responsables de iniciar y sustentar el proceso de angiogénesis. Algunas de estas vías de señalización conducen a la activación de la GTPasa pequeña Rac1 (Garrett y col. 2007), la cual es esencial en la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración de las células endoteliales (Conolly y col. 2002).

Estudios más recientes y llevados a cabo en cultivos primarios de células endoteliales humanas han identificado una cascada de señalización que involucra a un conjunto de GTPasas pequeñas, culminando en la migración celular endotelial y la morfogénesis vascular (Fernandez-Borja 2012; Sandri y col. 2012). Específicamente, la adhesión de células endoteliales a la matriz extracelular conduce a la activación de la GTPasa endosomal Rab5, a través de su factor intercambiador de nucleótidos (GEF) RIN2; evento que causa el reclutamiento del GEF de Rac1, TIAM1, hacia endosomas tempranos. La acumulación de TIAM1 en endosomas tempranos lleva a la activación espaciotemporal de Rac1, y en

consecuencia, a la reorganización polarizada de filamentos de actina, formando estructuras tipo *lamellipodios*, llevando a la migración direccional de células endoteliales y la morfogénesis vascular *in vitro* (Sandri y col. 2012).

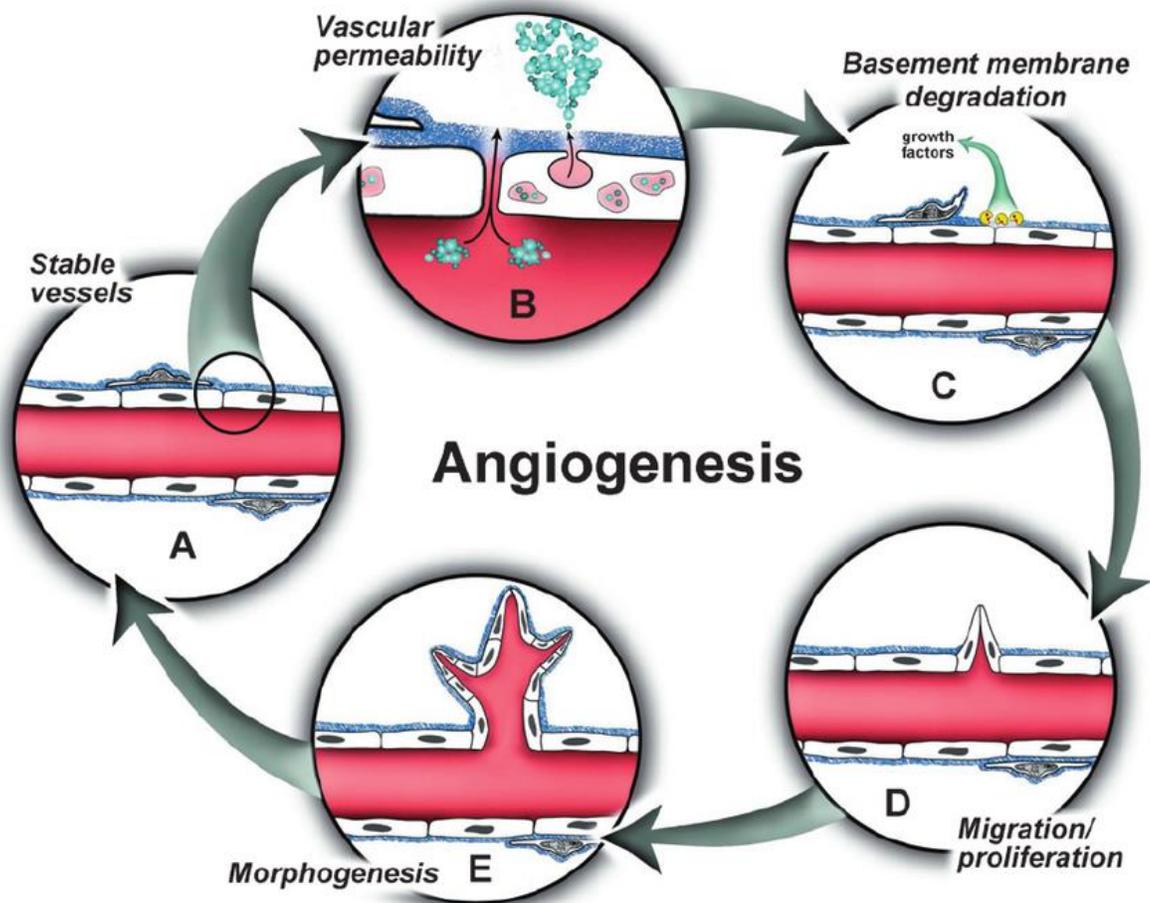


Figura 5 | Etapas del proceso de angiogénesis: A) Vaso sanguíneo estable. B) Aumento de la permeabilidad. C) Degradación de membrana basal. D) Migración/ Proliferación. E) Morfogénesis. (Bryan y D'Ámore 2007). Ver texto para más detalles.

VI.- Saliva y angiogénesis

Como se ha indicado previamente, la saliva humana contiene un conjunto de factores que potencialmente podrían facilitar la reparación de heridas, entre los cuales destaca el VEGF (Pammer y col. 1998). Por lo anterior, se podría pensar que la saliva humana promueve la angiogénesis por medio de VEGF. Lo anterior fue evaluado en ratones C57BL/6, a los cuales se les realizó una sialoadenectomía de las glándulas submandibulares (las principales productoras de VEGF salival), para posteriormente realizar una herida en el paladar. Estos estudios indicaron una fuerte correlación entre la disminución de la concentración de VEGF en el medio oral, con la angiogénesis observada en la herida (Keswani y col. 2013). En vista de los resultados obtenidos en estos modelos, sumado a la presencia de VEGF en saliva, es que se propuso que la saliva humana es capaz de promover la angiogénesis por medio de VEGF (Keswani y col. 2013). El problema con esta conclusión es que la saliva humana no presenta la misma composición, ni la misma concentración de factores de crecimiento que la saliva de modelos murinos (Brand y Veerman 2013); además, la temporalidad y características del cierre de heridas entre humanos y ratones tiende a diferir (Wong y col. 2009; Sullivan y col. 2001). Por último, **no existen estudios que demuestren de manera directa el efecto de la saliva humana sobre las células endoteliales**, protagonistas del proceso de angiogénesis, de tal manera que los resultados obtenidos por Keswani y col. deben ser cuidadosamente interpretados.

Las observaciones que indican que Histatina-1 contribuye positivamente en la re-epitelialización de heridas (Oudhoff y col. 2009a), y que promueve la migración celular, no tan sólo en queratinocitos orales (Oudhoff y col. 2008), sino además en fibroblastos orales, células no orales (Oudhoff y col. 2009b), y células no humanas (vanDjik y col. 2015), llaman la atención por su multifuncionalidad hacia distintos tipos celulares. Lo anterior toma valor, ya que no se ha evaluado el efecto de Histatina-1 en células endoteliales, aún cuando estas son fundamentales en la reparación de heridas. Por lo tanto, es relevante considerar si la saliva humana induce algún tipo de respuesta en células endoteliales, y específicamente, si su potencial efecto sobre la angiogénesis se deba a Histatina-1.

RESUMEN DE ANTECEDENTES

1) La reparación de heridas es llevada a cabo mediante diferentes etapas interrelacionadas.

2) Aún cuando las etapas sean las mismas, la reparación de heridas en mucosa oral es mucho más rápida que la reparación de heridas en piel.

3) Hay tanto factores intrínsecos de la mucosa oral como locales y ambientales en la cavidad oral que podrían explicar esta característica.

4) La saliva, tanto por su composición, como características físicoquímicas, es considerada un factor relevante en la contribución de la reparación de heridas orales.

5) La proteína salival Histatina-1 ha sido descrita como uno de los principales factores implicados en la reparación de heridas en mucosa oral, estimulando la migración de queratinocitos y fibroblastos, entre otros tipos celulares. Su efecto sobre células endoteliales no ha sido evaluado.

6) Pese a que la angiogénesis es un proceso fundamental en la reparación de heridas y que este proceso es estimulado por saliva, aún se desconocen los factores moleculares que contribuyen a ella.

7) La angiogénesis requiere de la activación de vías de señalización que llevan a la adhesión y migración de células endoteliales, así como la morfogénesis vascular.

8) No existen estudios directos que establezcan el efecto preciso de la saliva humana sobre las células endoteliales. Más aún, se desconocen los factores salivales implicados en este posible efecto.

Con lo anterior, es posible plantearse si Histatina-1 tiene un efecto sobre la funcionalidad de células endoteliales.

2. HIPÓTESIS.

La proteína salival Histatina-1 estimula la adhesión y migración de células endoteliales, actuando como un factor pro-angiogénico

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la Histatina-1 sobre la adhesión y migración de células endoteliales, así como en su potencial pro-angiogénico *in vitro*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Establecer el efecto de Histatina-1 en la migración y adhesión de células endoteliales *in vitro*.
- 2) Establecer el efecto de Histatina-1 en la proliferación de células endoteliales *in vitro*.
- 3) Establecer el efecto de Histatina-1 sobre la conformación estructural de células endoteliales *in vitro*.
- 4) Determinar el efecto de saliva humana sobre la migración de células endoteliales *in vitro*, y la dependencia de Histatina-1 en aquello.
- 5) Evaluar vías de señalización angiogénicas estimuladas por Histatina-1 en células endoteliales.

5. METODOLOGÍA.

1) Tipo de estudio

Estudio prospectivo, experimental.

2) Materiales

LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS. En base a los objetivos planteados es que se necesitaron de los siguientes tipos celulares:

1. Células endoteliales: Se utilizó la línea celular endotelial EA.hy926 (ATCC) y cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), obtenidas por colaboración con el laboratorio del Dr. Gareth Owen (Pontificia Universidad Católica de Chile). Estos modelos fueron usados para establecer el efecto de saliva e Histatina-1 sobre células endoteliales.
2. Células de epitelio oral: Se utilizó la línea celular de queratinocitos orales inmortalizados OKF6/Tert2 (ATCC). En esta línea celular se validó la actividad biológica de Histatina-1.

ANTICUERPOS. Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

1. Anticuerpo policlonal anti-Histatina-1 (sc98945), anticuerpo monoclonal anti-Rab5 (sc46692), anticuerpo monoclonal anti-FAK (sc1688), y anticuerpo policlonal anti-EEA1 (sc33585), todos de Santa Cruz Biotechnology.
2. Anticuerpo anti-fosfo-Y397-FAK (Cat #3283), Anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2, Anticuerpo anti-ERK1/2, fueron de Cell Signaling Technology.
3. Anticuerpo anti-Rac1 (610651) fue obtenido de Transduction Laboratories.
4. Anticuerpos anti-ratón y anti-conejo acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), y anticuerpo anti-actina (#A5316) fueron de Bio-Rad Laboratories.
5. Anticuerpos secundarios AlexaFluor-488 y AlexaFluor-568, así como la sonda falloidin-rodhamina, fueron obtenidas de Invitrogen.

MEDIO DE CULTIVO. Se utilizaron medios de cultivo, DMEM-rico en glucosa (DMEM-HG, células EA.hy926), DMEM libre de suero (SFM, células HUVECs) y

medio de queratinocitos libre de suero (KFSM-Gibco, células OKF6/Tert2), antibióticos y suero bovino fetal (FBS).

OTRO MATERIAL ESPECÍFICO. VEGF recombinante humano (GIBCO Life Technologies), trombina de plasma humano (Calbiochem EMD) y sustrato quimioluminiscente EZ-ECL (Pierce Chemical). Para ensayos de inmunodepleción y precipitación por afinidad, se usaron perlas de sefarosa proteína A/G (Pierce Chemical) y perlas de sefarosa-glutación (GE Healthcare), respectivamente.

3) Sujetos de estudio

En este estudio se reclutaron 5 donantes de saliva, los cuales se acercaron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para realizar dicha donación. Los donantes fueron previamente informados de los procedimientos y firmaron el consentimiento informado, aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (CEC, documento anexo). Se aplicaron los siguientes criterios para determinar la participación de los sujetos:

Criterios de inclusión:

Personas de sexo masculino o femenino, entre los 18 y 40 años de edad.

Criterios de exclusión:

Exposición a radioterapia de cabeza y cuello.

Diagnóstico de síndrome de Sjögren.

Consumo alguno de los siguientes fármacos:

- a) Amitriptilina, Imipramina, Sertralina, Fluoxetina.
- b) Furosemida, Hidroclorotiazida, Enalapril, Nifedipino, Losartan.

4) Metodología experimental

CULTIVO CELULAR. La línea celular endotelial EA.hy926 fue cultivada en medio DMEM-rico en glucosa suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibióticos, mientras que el cultivo primario de células HUVEC fueron cultivadas con medio SFM suplementado con FBS al 10%, antibióticos y suplemento de factores de crecimiento de células endoteliales. La línea celular inmortalizada de queratinocitos orales OKF6/Tert2 fue cultivada en medio KSFM suplementado con pituitaria de bovino y factor de crecimiento epitelial recombinante (rhEGF, Gibco).

Síntesis de Histatina-1 y validación de su actividad biológica.

SÍNTESIS DE HISTATINA-1. La síntesis química de Histatina-1 fue solicitada a la compañía Biomatik Corp (USA), en base a la secuencia aminoacídica Dp SHEKRHHGYRRKFHEKHSHREFPFYGDYGSNYLYDN, correspondiente al fosfopéptido de 38 aminoácidos, fosforilado en Serina2, conforme a lo descrito previamente (Oppenheim y col. 1988; Oudhoff y col. 2008). El péptido sintético, con un 98,9% de pureza y certificado como libre de residuos de ácido trifluoroacético (TFA), según certificación por HPLC y espectrometría de masas (certificación anexada al final de esta tesis), fue re-suspendido en agua miliQ, a una concentración stock de 1mM.

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT. Una vez obtenida la Histatina-1, libre de residuos de TFA, ésta fue sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), para posteriormente ser transferida a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con anticuerpo primario policlonal (anti-Histatina-1). Los anticuerpos primarios unidos fueron detectados por un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) y el sistema de quimioluminiscencia EZ-ECL (Pierce Chemical). El procedimiento anterior buscó validar efectivamente que el péptido sintetizado químicamente correspondiese a Histatina-1, y establecer con precisión la ubicación de la banda de Histatina-1 en la membrana, esto pues se sabe que las proteínas ricas en histidina, como Histatina-1, migran más lentamente en un SDS-PAGE (Oppenheim y col. 1988).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA. Dado que Histatina-1 presenta actividad antifúngica (Oudhoff y col.2008), se consideró importante validar la actividad biológica de Histatina-1 sintética, a través de ensayos de inhibición del crecimiento de colonias de *Cándida albicans* (Oudhoff y col. 2008). Lo anterior fue realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Alfredo Molina, Laboratorio de Farmacología, del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas. Brevemente, las cepas ATCC10231 y ATCC90029 de *C. albicans* fueron crecidas sobre placas de agar-cloranfenicol Sabouraud (Biokar Diagnostics, Allonne, France) e incubadas a 37°C por 24 horas. Colonias únicas fueron crecidas en suspensión, usando medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en presencia o ausencia de Histatina-1 20µM, por 24 horas a 37°C, para finalmente hacer lectura de la absorbancia a 450nm en lector de microplacas (Infinite F50; Tecan, Zurich, Switzerland).

VALIDACIÓN EN CÉLULAS EPITELIALES ORALES. Dado que Histatina-1 estimula la migración de queratinocitos orales en cultivo (Oudhoff y col. 2008), se realizó un ensayo de cierre de heridas con la línea celular OKF6/Tert2, como método alternativo de validación de la actividad biológica de Histatina-1. Se sembraron 100.000 células/pocillo (se utilizaron placas de 24 pocillos), con el fin de generar una monocapa de células a las 24 horas de cultivo. Una vez generadas las monocapas, éstas fueron rasgadas con una punta de pipeta (p200), lo que generó un área libre de células (herida), sobre la cual se capturaron imágenes. Una vez realizado esto, las células se incubaron por 16 horas en ausencia o presencia de Histatina-1 a concentración de 10µM, estando en concordancia con la concentración fisiológica en saliva (Castagnola y col. 2002; Sun y col. 2009; Campese y col. 2009). Al término del tiempo, las células se fijaron con una solución de cristal violeta al 0,1% en etanol al 20%, para nuevamente capturar imágenes.

El porcentaje de cierre de heridas se calculó por medio de la siguiente fórmula:

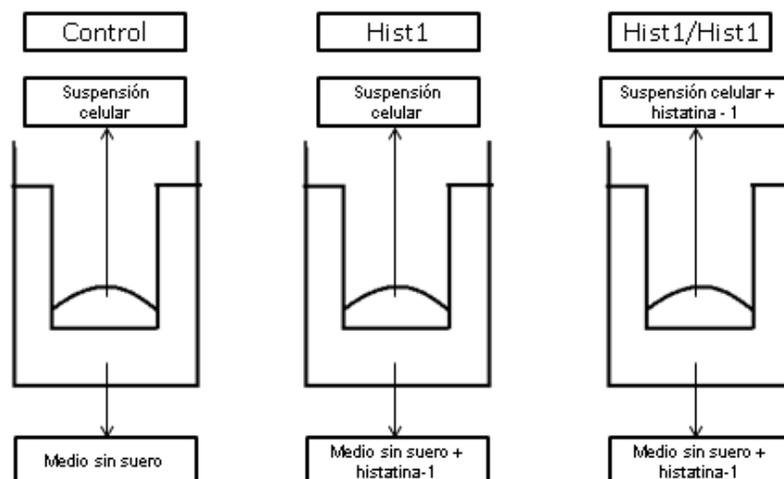
$$\% \text{ cierre} = 100 - \left[\frac{A/L \text{ Promedio tiempo final}}{A/L \text{ Promedio tiempo inicial}} * 100 \right]$$

En donde; A: ancho de la herida; L: largo de la herida

Metodología Objetivo Específico 1: “Establecer el efecto de Histatina-1 en la migración y adhesión de células endoteliales *in vitro*”

1.- *Ensayo de cierre de heridas en línea celular EA.hy926.* Se utilizó el mismo protocolo anteriormente indicado, utilizando esta vez la línea celular EA.hy926, y cambiando el tiempo de incubación por 24 horas

2.- *Ensayo de trans migración en cámara Boyden en línea celular EA.hy926.* Se utilizaron pocillos de 6,5 mm de diámetro y 8 μm de tamaño de poro (Transwell™ Costar). El fondo de los pocillos fue recubierto con fibronectina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, se agregó al interior del pocillo 100 μl de una suspensión de células EA.hy926 (500.000 células/ml) y se evaluaron tres condiciones: sin adición de Histatina-1 (control agua miliQ), con adición de Histatina-1 (10 μM) en la cámara inferior, y con adición de Histatina-1 (10 μM), tanto en la cámara inferior, como superior, de acuerdo a lo indicado en el siguiente esquema:



Una vez realizado lo anterior, las células fueron incubadas por 1 hora al interior de estas cámaras, para posteriormente ser fijadas con cristal violeta al 0,1% en metanol al 20%. Una vez fijadas, las células que migraron fueron visualizadas y cuantificadas en microscopio óptico.

3.- *Ensayo de adhesión en línea celular EA.hy926.* Células EA.hy926 fueron recolectadas y puestas en suspensión en medio de cultivo, sin suero bajo dos condiciones, con Histatina-1 adicionada a una concentración de 10 μM , o en ausencia de Histatina-1 (condición control, agua miliQ). Posteriormente se adicionaron 100 μl de cada suspensión (5×10^5 células/ml), a placas de 24 pocillos recubiertas previamente con fibronectina (2 $\mu\text{g/ml}$), permitiendo a las células adherirse durante 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos. Finalizado el período, se lavaron los pocillos suavemente con medio sin suero para remover las células que no se adhirieron, para después fijar las células adheridas con cristal violeta al 0,1% en metanol al 20%. Por último, el colorante se eluyó con metanol al 100%, y se determinó la absorbancia a 600 nm.

4.- *Ensayo de expansión (“spreading”) en línea celular EA.hy926.* Células EA.hy926 fueron recolectadas y puestas en suspensión en medio de cultivo, bajo las mismas condiciones indicadas en el punto anterior. Posteriormente se adicionaron 100 μl de cada suspensión señalada (5×10^5 células/ml), a placas de 24 pocillos recubiertas con fibronectina 2 $\mu\text{g/ml}$, permitiendo a las células adherirse y expandirse durante 30 minutos. Finalizado el período, se lavaron los pocillos con medio sin suero para remover las células que no se adhirieron, para después fijarlas con cristal violeta al 0,1% en metanol al 20%. Por último, se tomaron fotografías y se cuantificaron las células que manifestaron extensiones de membrana usando el Software *Image J*.

5.- *Video-microscopía de células EA.hy926.* Para este ensayo, células EA.hy926 fueron dejadas en pocillos recubiertos por fibronectina (2 $\mu\text{g/mL}$) y se dividieron en dos condiciones, una condición sin tratamiento y otra bajo tratamiento de Histatina-1 (10 μM). Posterior a esto se observaron por medio de un microscopio de epifluorescencia en cámara humidificada, y se obtuvieron imágenes a los siguientes intervalos de tiempo: 0, 2, 6, 10, 16, 20, 40 y 60 minutos. Finalmente se cuantificó el área de extensión que presentaron las células, para lo cual se recurrió al software *Image J*.

Metodología Objetivo Específico 2: “Establecer el efecto de Histatina-1 en la proliferación de células endoteliales *in vitro*”

Células EA.hy926 fueron sembradas en placas de 96 pocillos (1×10^4 células/pocillo), y se dejaron incubar bajo las siguientes condiciones: (a) presencia de Histatina-1 ($10 \mu\text{M}$) por 48 horas; (b) presencia de Histatina-1 ($10 \mu\text{M}$) por 24 horas; (c) control ausencia de Histatina-1 (agua miliQ) por 48 horas. Una vez finalizados los periodos establecidos, se cuantificó la proliferación/viabilidad celular por medio del ensayo de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], el cual corresponde a una prueba colorimétrica que permite evaluar la actividad mitocondrial celular. Entonces a cada placa se le adicionó la solución de MTS, y se dejaron las placas en cultivo durante 1 hora, a 37°C , bajo una atmósfera de 5% CO_2 . Una vez cumplido el tiempo se registró la absorbancia a 490 nm.

Metodología Objetivo Específico 3: “Establecer el efecto de Histatina-1 sobre la conformación estructural de células endoteliales *in vitro*”.

Dada la capacidad de las células endoteliales para formar estructuras tipo capilares *in vitro*, se realizó un ensayo de formación de redes vasculares, según lo descrito por Aranda y Owen el año 2009 (Aranda 2009). Este ensayo se realizó en colaboración con el Dr. Gareth Owen (PUC), y para ello, se suspendieron células endoteliales HUVECs o EA.hy926 en medio sin suero, para posteriormente sembrarlas en la parte superior de placas recubiertas con Matrigel reducido en factores de crecimiento (BD Biosciences), durante 6-8 horas a 37°C . Se evaluaron las siguientes condiciones, tanto para HUVECs, como para EA.hy926, ambas en medio sin suero:

- a) Condición control vehículo: agua miliQ.
- b) Condición control negativo: trombina 1 UI/ml.
- c) Condición control positivo: VEGF 10 ng/ml.
- d) Condición Histatina-1: Histatina-1 a concentración $10 \mu\text{M}$.

Una vez finalizado el período de incubación, se fotografiaron los cultivos (5 imágenes por condición). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software *Image J*.

Metodología Objetivo Específico 4: “Determinar el efecto de saliva humana sobre células endoteliales *in vitro*, y la implicancia de Histatina-1 en aquello”

RECOLECCIÓN DE SALIVA COMPLETA. Se reclutaron 5 donantes, de acuerdo con los criterios mencionados anteriormente, los cuales fueron citados entre las 8:00h y 10:00h. Se pidió a los donantes reunir 2 ml de saliva en un tubo eppendorf, al menos 30 minutos después de la última comida y cepillado. Inmediatamente después de recolectada la saliva, ésta se centrifugó a 13.000xg, durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvo un sobrenadante, al cual se añadió un *cocktail* de inhibidores de proteasas (PMSF y BAL) e inhibidor de fosfatasa (ortovanadato de sodio). Posteriormente, cada muestra fue ajustada a pH 7,4.

INMUNODEPLECIÓN DE HISTATINA-1. Histatina-1 fue inmunodepletada desde muestras de saliva mediante precipitación con anticuerpo específico. Se pre-cubrieron perlas de proteína A sefarosa con 4 µg de anticuerpo policlonal anti-Histatina-1 ó anti-HSP90 (IgG irrelevante), por 2 horas a 4°C en agitador rotatorio. Una tercera condición consistió en perlas no fueron pre-cubiertas con anticuerpo e igualmente incubadas por 2 horas a 4°C. Posteriormente, las perlas fueron lavadas con PBS y agregadas a 500µl de sobrenadante de saliva o tampón de saliva (Na₂CO₃ 30 mM, KCl 10 mM, K₂HPO₄ 6 mM, KSCN 3 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,1 mM, pH 7,4) (Oudhoff y col. 2008), de la siguiente manera:

500 µl Tampón de saliva 20µl Perlas sin anticuerpo	500 µl Sobrenadante de saliva 20µl Perlas sin anticuerpo	500 µl Sobrenadante de saliva 20µl Perlas anticuerpo IgG	500 µl Sobrenadante de saliva 20µl Perlas anticuerpo hist1
---	---	---	---

Una vez agregadas las perlas, el conjunto de muestras se dejaron por 2 horas a 4°C en agitador rotatorio. Posteriormente, el material inmunoprecipitado (perlas) fue analizado por Western blot, mientras que sobrenadante fue utilizado para ensayos de trans migración en Cámara Boyden (cada sobrenadante fue diluido 1:3 en medio libre de suero), y para análisis por Western blot.

Metodología Objetivo Específico 5: “Evaluar vías de señalización angiogénicas estimuladas por Histatina-1”

Es sabido que la angiogénesis depende de la migración y adhesión de las células endoteliales a la matriz extracelular (Carmeliet 2000), y que este proceso depende de la activación de Rac1 y su efecto sobre la reorganización del citoesqueleto de actina (Conolly y col. 2002). Recientemente se estableció que la adhesión celular endotelial a la matriz extracelular conduce a la activación de la GTPasa Rab5 a través de su activador RIN2, un evento que es seguido por el reclutamiento de TIAM1 dentro de endosomas tempranos, lo cual lleva a la activación de Rac1, estimulando la migración celular y morfogénesis vascular (Sandri y col. 2012). Teniendo en cuenta lo anterior es que se plantearon los siguientes procedimientos:

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RAC1 Y RAB5. Para evaluar el efecto de Histatina-1 sobre la activación de Rab5 y Rac1, se realizaron ensayos de precipitación por afinidad (o *pull-down*) GST-R5BD y GST-PBD, respectivamente, de acuerdo con lo descrito por Mendoza y col. 2013, y por Silva y col. 2016. Estos ensayos permiten identificar y cuantificar las fracciones de Rab5 activo (unido a GTP) y Rac1 activo (unido a GTP), y el efecto de Histatina-1. Para ello, células EA.hy926 fueron cultivadas por 24 horas, para luego ser tratadas con medio sin suero conteniendo o no Histatina-1 (10 μ M), por 60 minutos. Las células fueron homogenizadas, y los extractos fueron incubados por 5 minutos en hielo, para posteriormente ser centrifugados a 10.000xg durante 1 minuto a 4°C. Los sobrenadantes fueron incubados con perlas de glutatión-sefarosa precubiertos con GST-R5BD (Glutatión-S-transferasa Rab5-Binding-domain) o GST-PBD (Glutatión-S-transferasa Rac1-Binding-domain) por condición, durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, las perlas fueron recolectadas y lavadas con buffer NP-40 al 0,01%, para posteriormente ser analizadas mediante Western blot.

TRANSFECCIÓN DE MUTANTES DE RAB5 Y RAC1. Según lo demostrado por Sandri y col. el año 2012, la activación de Rac1 dependería de la activación previa de Rab5, para así tener como efecto final la migración celular endotelial. Es por lo anterior que se realizó una transfección transitoria, con el objetivo de evaluar el

efecto de la inactivación de Rab5 sobre Rac1, en el contexto de la presencia de Histatina-1. Además, esta estrategia permite evaluar la migración endotelial en presencia de Histatina-1, frente a la expresión de cada una de estas mutantes.

Para ello, células EA.hy926 fueron cultivadas por 24 horas en medio completo hasta alcanzar una confluencia de entre 50%-70%. La transfección se realizó con 2 μ g de los siguientes plasmidios: pEGFP-C1 (vector vacío, EV), pEGFP-Rab5/S34N (Rab5 mutante inactiva, S34N) o pEGFP-Rac1/T17N (Rac1 mutante inactiva, T17N). Para transfectar, se utilizó el sistema de lipofectamina 2000. Las células transfectadas fueron utilizadas tanto para ensayos de precipitación por afinidad GST-R5BD y GST-PBD, como para ensayos de transmigración en Cámara Boyden, en presencia o ausencia de Histatina-1 (10 μ M).

LOCALIZACIÓN DE COMPONENTES DEL EJE RAB5-RAC1. Según lo establecido por Sandri y col. el año 2012, el “eje Rab5-Rac1” involucra el reclutamiento de la GEF-Rab5, RIN2, hacia endosomas tempranos. Por lo anterior, se evaluó el efecto de Histatina-1 sobre la localización de RIN2 en células endoteliales EA.hy926, mediante inmunofluorescencia indirecta. Los endosomas tempranos fueron visualizados marcando contra el antígeno de endosomas tempranos 1 (EEA1) (Mendoza y col. 2013). Para llevar a cabo este ensayo, células EA.hy926 se dividieron en dos condiciones, una no tratada, y otra tratada con Histatina-1 (10 μ M) durante 30 minutos, para posteriormente ser fijadas y teñidas con anticuerpo monoclonal anti-RIN2 y anticuerpo policlonal anti-EEA-1. A continuación estos anticuerpos fueron identificados por anticuerpos secundarios conjugados a AlexaFluor-568 o AlexaFluor-488 respectivamente. Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal.

DETECCIÓN DE ERK y FAK FOSFORILADOS. Además del “eje Rab5-Rac1”, se sabe que las moléculas de señalización ERK y FAK son relevantes para la migración endotelial y la angiogénesis (Lamalice y col. 2007). Por ello se evaluó la activación de estas proteínas frente al tratamiento de Histatina-1. Para realizar este ensayo, células EA.hy926 fueron tratadas con Histatina-1 (10 μ M) durante 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos en medio sin suero. Como control positivo se trataron células EA.hy926

expuestas a suero al 10% por 30 minutos. Una vez finalizado el periodo, se homogenizaron las células, y el extracto fue sometido a SDS-PAGE, para posteriormente realizar un ensayo de Western blot, utilizando anticuerpos primarios dirigidos hacia las siguientes proteínas: FAK total, FAK fosforilado en Tirosina 397, ERK1/2 total, ERK1/2 activo (fosforilado), y actina.

5) Análisis estadístico

Cuando fue pertinente, los resultados se compararon usando prueba t de muestra única, prueba t de muestra pareada, prueba t no apareada con corrección de Welch, o ANOVA de dos vías, utilizando el software *GraphPad Prism 5* (San Diego, CA). Se compararon los valores promediados de al menos tres experimentos independientes. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

5. RESULTADOS

SÍNTESIS DE HISTATINA-1 Y VALIDACIÓN DE SU ACTIVIDAD

Síntesis de Histatina-1 e identificación

El péptido DpSHEKRHHGYRRKFHEKHSHREFPFYGDYGSNYLYDN, con una fosforilación en Serina2, correspondiente a Histatina-1 (**Figura 3**), fue obtenido por síntesis química desde la Compañía Biomatik Corp (USA), con un 98,9% de pureza y libre de residuos de ácido trifluoroacético (TFA), según certificación por HPLC y espectrometría de masas (certificado anexo Biomatik Corp, USA). La identidad de este péptido fue demostrada por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), tanto por tinción de Rojo Ponceau (**Figura 6A**), como por Western Blot, usando un anticuerpo específico contra Histatina-1 (**Figura 6B**).

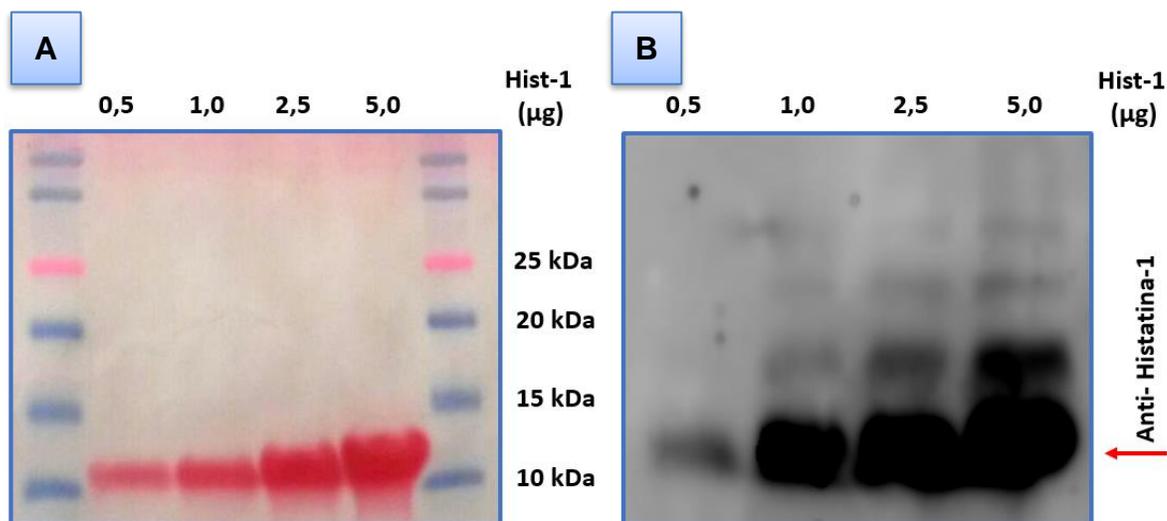


Figura 6 | Identificación de Histatina-1: (A) Separación de Histatina-1 sintética mediante electroforesis (SDS-PAGE al 15%) y tinción de Rojo Ponceau. Cantidades crecientes del péptido fueron cargadas a cada carril (0,5; 1,0; 2,5; y 5,0 µg, respectivamente). (B) Análisis de Western blot de Histatina-1 sintética, usando anticuerpo policlonal anti-Histatina-1 (Santa Cruz Biotechnology). Cantidades crecientes del péptido fueron cargadas a cada carril (0,5; 1,0; 2,5; y 5,0 µg, respectivamente).

Posteriormente, para todos los experimentos reportados en esta tesis, y a excepción de donde se explicita, la concentración de Histatina-1 usada fue de 10 µM, valor correspondiente a la concentración encontrada en saliva (Castagnola y col. 2002).

Validación de la actividad de Histatina-1

Debido a que Histatina-1 actúa, tanto como agente antifúngico, como pro-migratorio (Oudhoff y col. 2008), se optó por usar ambos parámetros, como validación de la actividad de Histatina-1 sintética, primeramente, en un ensayo de inhibición de crecimiento de *Cándida albicans* y posteriormente, evaluando su capacidad de estimular la migración de queratinocitos orales en cultivo.

Para el ensayo de inhibición de crecimiento de *C. albicans*, 2 cepas comerciales (ATCC90029 y ATCC10231) fueron cultivadas en ausencia o presencia de Histatina-1 (20 μ M). Luego de 24 horas (37°C), se evaluó la absorbancia a 450nm, observándose que Histatina-1 inhibe significativamente el crecimiento de *C. albicans* (**Figura 7A**).

Posteriormente, se evaluó la capacidad pro-migratoria de Histatina-1 en queratinocitos orales (OKF6/Tert2), mediante ensayo de cierre de herida (**Figura 7B**). Para ello, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una monocapa, las cuales fueron rasgadas con una punta de pipeta. Realizado esto, se dejaron incubando por 16 horas en ausencia y presencia de Histatina-1 (10 μ M). El porcentaje de cierre de herida se determinó mediante análisis de imágenes a tiempo 0 y 16 horas. Como se puede ver en la **Figura 7C**, Histatina-1 promueve el cierre de heridas en queratinocitos orales OKF6/Tert2.

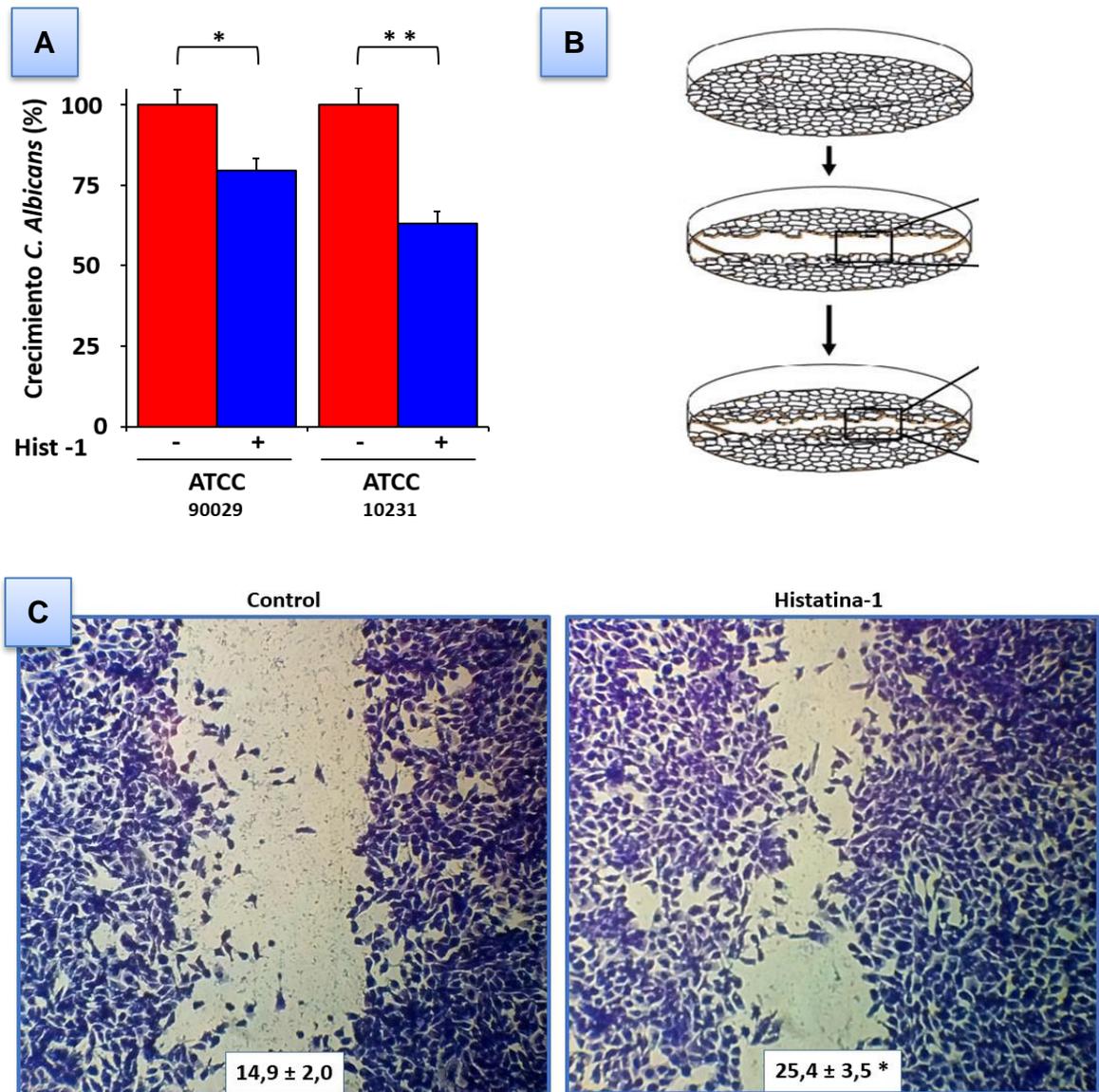


Figura 7 | Validación de actividad de Histatina-1: (A) Ensayo de inhibición de crecimiento de *C. albicans*. Los resultados son expresados como porcentaje de crecimiento respecto a la situación control (sin Histatina-1, sólo vehículo agua miliQ). (B) Esquema del ensayo de cierre de heridas. (C) Determinación de la migración de células OKF6/Tert2 mediante ensayo de cierre de heridas. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes, en donde los valores numéricos corresponden al porcentaje de cierre de heridas (promedio ± error estándar). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Los resultados anteriormente expuestos nos permiten validar la funcionalidad de Histatina-1 sintética, dándonos paso para continuar con los objetivos planteados en esta tesis.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1. ESTABLECER EL EFECTO DE HISTATINA-1 EN LA MIGRACIÓN Y ADHESIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*

Histatina-1 promueve la migración de células endoteliales

Histatina-1 es uno de los principales factores presentes en saliva que promueve la reparación de heridas, ya que estimula la migración de células epiteliales orales y acelera el proceso de re-epitelialización (Oudhoff y col. 2008; Oudhoff y col. 2009a). En vista que estudios posteriores demostraron el mismo efecto promotor de la migración en otros tipos celulares, como fibroblastos orales y de piel, así como en células epiteliales de colon y tumorales (Oudhoff y col. 2009b), es intrigante el hecho que no existan estudios que evalúen el efecto de Histatina-1 en células endoteliales, aún cuando éstas son fundamentales para la angiogénesis durante la reparación de heridas. Por lo tanto, este objetivo se enfocó en evaluar el efecto de Histatina-1 sobre la migración de células endoteliales, usando 2 aproximaciones complementarias: el ensayo de cierre de heridas y el ensayo de transmigración en Cámara Boyden.

El ensayo de cierre de heridas fue llevado a cabo con la línea celular endotelial EA.hy926, siguiendo el protocolo empleado en la línea celular epitelial OKF6/Tert2, modificando solo el tiempo de incubación (24 horas, en lugar de 16 horas). En la **Figura 8A** se muestran imágenes representativas del ensayo, en el cual Histatina-1 indujo un aumento sustancial en el porcentaje de cierre de heridas (Control 31,4% v/s Histatina-1 46,1%).

Para complementar el ensayo de cierre de heridas, sobre el cual pueden influir otras variables, como la proliferación celular, se realizó el ensayo de transmigración en Cámara Boyden, usando como sustrato haptotáctico fibronectina y permitiendo la migración por 1 hora a 37°C, evaluando las siguientes condiciones: Control, Histatina-1 en el exterior del inserto, e Histatina-1, tanto en el interior, como en el exterior del inserto (esquema detallado en la sección metodología). En la **Figura 8B** es posible ver imágenes representativas del ensayo, y en la **Figura 8C** la cuantificación correspondiente, donde se observa que Histatina-1 promueve un aumento de 5 veces en la migración celular.

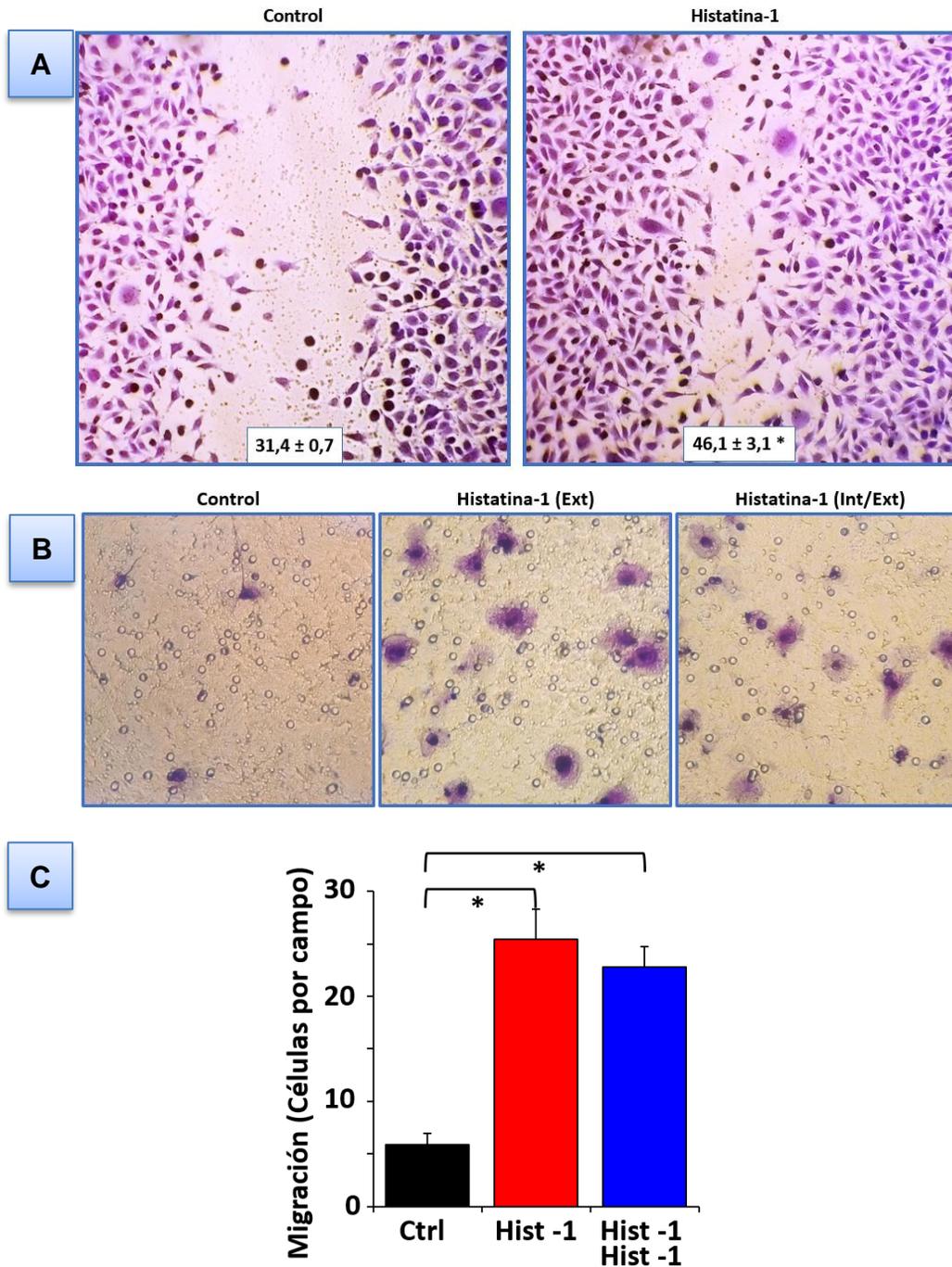


Figura 8 | Histatina-1 promueve la migración de células endoteliales: **(A)** Ensayo de cierre de heridas en células endoteliales EA.hy926. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes, en donde los valores numéricos corresponden al porcentaje de cierre de herida (promedio \pm error estándar). **(B)** Ensayo de trans migración en Cámara Boyden de células EA.hy926. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes, para cada una de las condiciones, Control, Histatina-1 presente en el exterior de la cámara (Ext), e Histatina-1 presente, tanto en el exterior, como en el interior de la cámara (Int/Ext). **(C)** Gráfica de cuantificación del ensayo de trans migración detallado en (B). Los datos son expresados como número de células por campo (3 experimentos independientes). $*P < 0,05$

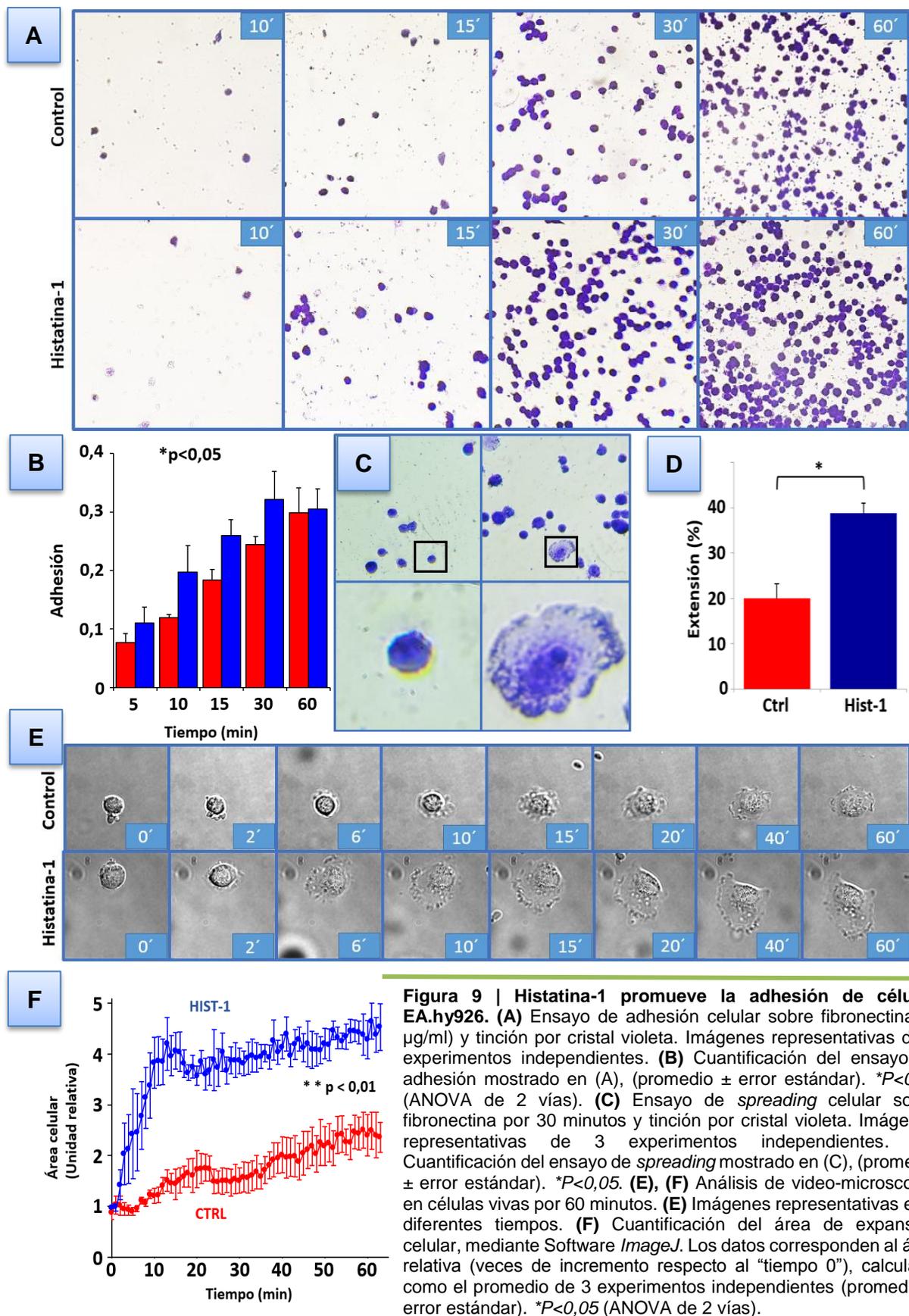
Histatina-1 promueve la adhesión de células endoteliales

Debido a que la migración celular depende de la adhesión a la matriz extracelular, se evaluó el efecto de Histatina-1 en la adhesión de células EA.hy926 sobre fibronectina, un ligando de la integrina $\alpha_5\beta_1$ ampliamente expresada en células endoteliales (Macarak y Howard 1983). Para tal efecto, se realizaron 3 tipos de ensayos: adhesión celular propiamente tal, “*spreading*” o expansión celular, y video-microscopía.

Para el ensayo de adhesión, las células fueron puestas en suspensión y se les permitió adherirse en pocillos recubiertos con fibronectina (2 $\mu\text{g/ml}$), en ausencia o presencia de Histatina-1, durante distintos intervalos de tiempo. Finalizado el periodo, las muestras fueron fijadas y teñidas con cristal violeta, para medir la adhesión celular por absorbancia a 600 nm. En la **Figura 9A** se muestran imágenes representativas del ensayo, y en la **Figura 9B**, la cuantificación correspondiente, donde se observa que Histatina-1 acelera la cinética de adhesión a fibronectina.

El ensayo de “*spreading*” permite evaluar la expansión del área celular frente a un ligando como la fibronectina, imitando las etapas iniciales de la migración celular (Ridley y col. 2003; Bryan y D’Ámore 2007). Para ello, células EA.hy926 en suspensión fueron sembradas sobre pocillos recubiertos con fibronectina (2 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos, en ausencia o presencia de Histatina-1. Luego, las células fueron teñidas con cristal violeta y registradas al microscopio óptico, contabilizando como positivas aquellas que presentaron extensiones de membrana. En la **Figura 9C** se muestran imágenes representativas, mientras que en la gráfica de la **Figura 9D** se muestra una cuantificación, en donde Histatina-1 produjo un aumento en el porcentaje de células expandidas (Control, 18% v/s Histatina-1, 35%).

Finalmente, se evaluó la cinética de expansión celular durante 60 minutos, en ausencia y presencia de Histatina-1, mediante video-microscopía. Como se puede ver en la **Figura 9E** y su gráfico correspondiente (**Figura 9F**), Histatina-1 aumenta la cinética con la cual las células endoteliales aumentan su área de expansión, como producto del incremento en sus extensiones de membrana.



OBJETIVO ESPECÍFICO 2. ESTABLECER EL EFECTO DE HISTATINA-1 EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*

Los resultados anteriormente expuestos nos permiten concluir que Histatina-1 promueve la migración y adhesión endotelial, ambos fenómenos cruciales para que se produzcan cambios sustanciales en el proceso de angiogénesis (Carmeliet 2000). Sin embargo, estos eventos no son los únicos asociados a la angiogénesis. Por lo anterior, nos propusimos determinar el efecto que pudiese tener Histatina-1 sobre la proliferación celular endotelial. Con este fin, se utilizó en primera instancia por su simplicidad, el ensayo de MTS (Promega), el cual permite estimar de manera general cambios en la viabilidad celular, como consecuencia de fluctuaciones, ya sea en la proliferación, en la muerte celular, o en ambas, entre otros eventos. Como es posible ver en la **Figura 10**, Histatina-1 no afectó la viabilidad de células metabólicamente activas, lo que nos permitiría reforzar la idea de que Histatina-1 influye principalmente en los fenómenos de migración celular (Oudhoff y col. 2008; Oudhoff y col. 2009a).

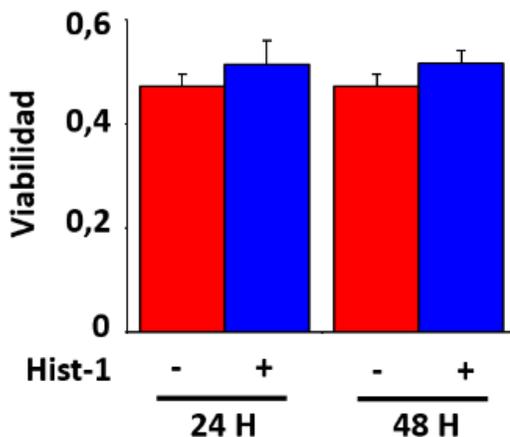


Figura 10 | Histatina-1 no afecta la viabilidad de células endoteliales EA.hy926. La viabilidad de células metabólicamente activas fue evaluada por ensayo de MTS. Células EA.hy926 fueron cultivadas durante 24 y 48 horas en ausencia o presencia de Histatina-1 (10 μ M), para posteriormente realizar el análisis de metabolización del sustrato MTS, según protocolo del proveedor (ver materiales y métodos para más detalles), midiendo la absorbancia a 490 nm. Los datos presentados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar).

OBJETIVO ESPECÍFICO 3. ESTABLECER EL EFECTO DE HISTATINA-1 SOBRE LA CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE CÉLULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*

Una vez establecidos los efectos de Histatina-1 sobre la adhesión y migración celular endotelial, evaluamos si es que estos efectos inciden en un fenómeno más complejo, la reestructuración endotelial. Lo anterior basado en la propiedad intrínseca de las células endoteliales para formar estructuras poligonales tipo capilares en Matrigel (Aranda y Owen 2009). Para llevar a cabo este objetivo, se utilizó el ensayo de formación de redes vasculares *in vitro*, usando 2 modelos celulares, la línea celular endotelial EA.hy926 y el cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano, HUVECs.

Primeramente, se observó que ambos tipos celulares tienen la capacidad de formar espontáneamente estructuras capilares en condiciones no estimuladas (control). Además, como control positivo para la inducción de la formación de estructuras capilares, se utilizó VEGF, el cual aumentó de manera significativa la formación de estas estructuras, mientras que la presencia de trombina disminuyó la estructuración celular, hacia niveles aún por debajo de lo observado en la situación control sin estimulación (**Figura 11A y 11B**). De manera interesante, se observó que la presencia de Histatina-1, en ambos tipos celulares, incrementó de manera sustancial la formación de estructuras capilares, incluso a niveles similares a lo observado con VEGF (**Figura 11A y 11B**). La cuantificación de la formación de estructuras capilares en células EA.hy926 (**Figura 11C**) y HUVECs (**Figura 11D**), obtenida de 3 experimentos independientes, indicó que ambos casos, Histatina-1 produce un aumento significativo en la formación de este tipo de estructuras.

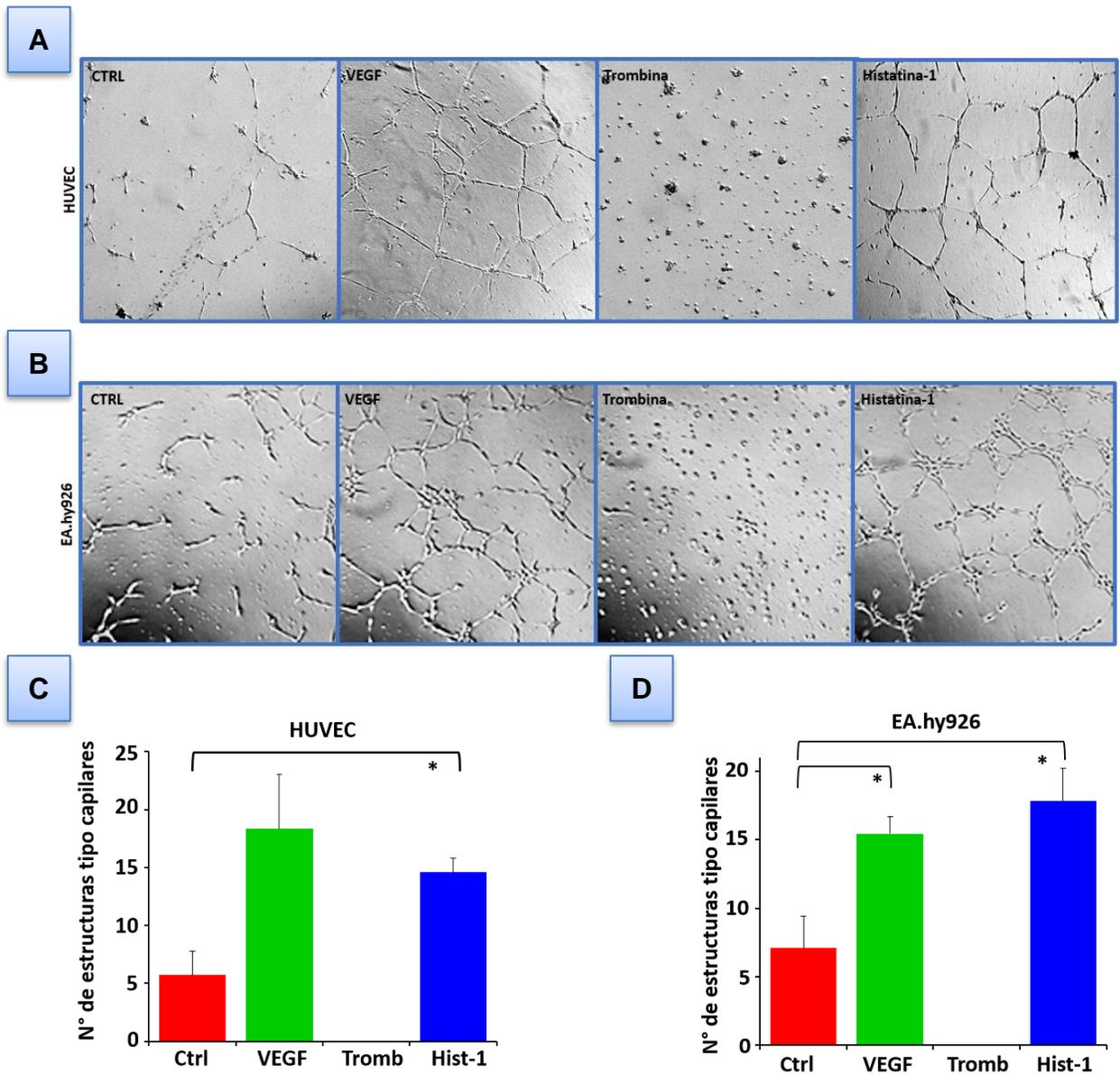


Figura 11 | Histatina-1 promueve la morfogénesis vascular *in vitro*. (A) y (B) Ensayo de formación de redes vasculares *in vitro*. Imágenes representativas obtenidas en células HUVEC (A) y EA.hy926 (B), a partir de 3 experimentos independientes. En (C) y (D) se muestra la cuantificación del número de estructuras tipos capilares, obtenidos mediante el Software *Image J*, tanto para células HUVEC (A), como para células EA.hy926 (B), a partir de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar). * $P < 0,05$.

OBJETIVO ESPECÍFICO 4. DETERMINAR EL EFECTO DE LA SALIVA HUMANA SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*, Y LA IMPLICANCIA DE HISTATINA-1 EN AQUELLO

Es reconocido que la saliva humana, por su contenido, tiene efectos benéficos en la reparación de heridas por medio de la estimulación migratoria sobre queratinocitos orales (Brand y col. 2014). Sin embargo, no hay pruebas directas de que la saliva humana estimule la migración de células endoteliales, ni mucho menos que estimule el proceso de angiogénesis. Lo más cercano es un trabajo en el cual correlacionan VEGF salival con la angiogénesis inducida por una incisión en mucosa palatina de ratones C57BL/6 (Keswani y col. 2013). Lo anterior es crítico, pues la secreción salival y concentración de factores de crecimiento, como VEGF, difiere considerablemente entre la saliva humana y en modelos murinos (Brand y Veerman 2013). Todo esto, sumado a los hallazgos descritos en este presente trabajo de investigación, donde Histatina-1 sintética promueve la migración de células endoteliales, nos llevan a plantear la posibilidad de que la saliva humana como tal, es capaz de promover la migración de células endotelial, e importantemente, que este potencial efecto sea debido a la presencia de Histatina-1 en este fluido.

La saliva humana promueve la migración celular endotelial

Para evaluar el efecto de la saliva humana en la migración de células endoteliales EA.hy926, se realizaron ensayos de trans migración en Cámara Boyden, ya sea en presencia de saliva humana o en presencia de un tampón saliva (análogo a la saliva humana, tanto en pH, como composición iónica y mineral; Oudhoff y col. 2008). De manera impactante, se observó que en las 5 condiciones examinadas (5 donantes de saliva) la exposición a saliva humana produjo un aumento sustancial en la migración celular endotelial, comparado con las respectivas condiciones control (**Figura 12**).

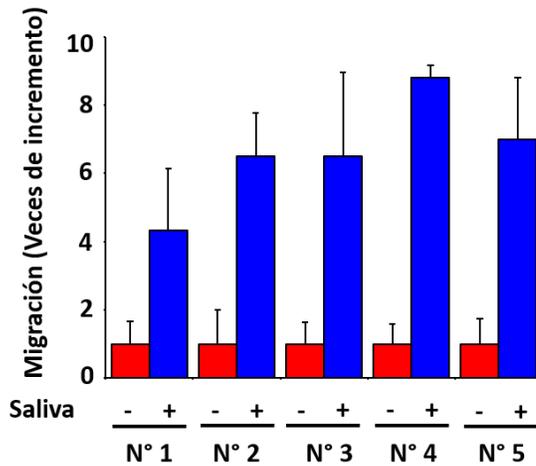


Figura 12 | La saliva humana promueve la migración celular endotelial. Muestras de saliva completa fueron obtenidas de 5 donantes sanos (N°1, N°2, N°3, N°4, N°5). Cada muestra de saliva fue tratada para ajuste de pH y remoción de material particulado, de acuerdo a lo descrito en los materiales y métodos, para ser utilizada en ensayos de trans migración en Cámara Boyden. Para cada condición experimental, se utilizó buffer saliva (Na₂CO₃ 30 mM, KCl 10 mM, K₂HPO₄ 6 mM, KSCN 3 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,1 mM, pH 7,4). Los datos son mostrados como veces de incremento (respecto al control buffer saliva) y corresponden a experimentos independientes, realizados por donante, en cuadruplicado.

Histatina-1 es requerida para el efecto pro-migratorio de la saliva humana sobre células endoteliales

Para determinar la participación de Histatina-1 en la migración celular endotelial inducida por saliva, se planteó como estrategia la “*inmunodepleción*” de Histatina-1, realizándose ensayos de inmunoprecipitación de Histatina-1, desde cada una de las muestras de saliva, como se indica en la **Figura 13**:

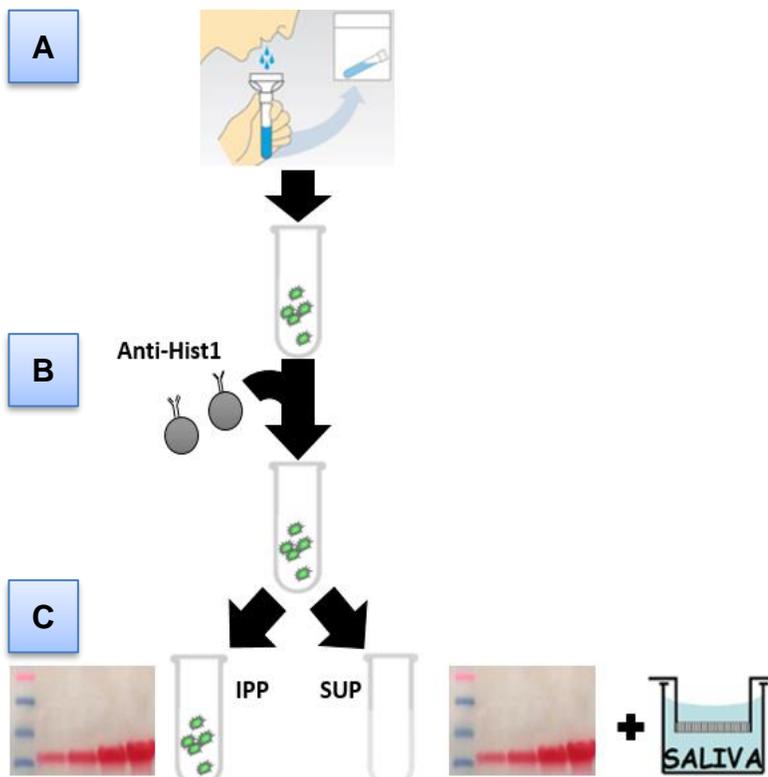


Figura 13 | Obtención y tratamiento de la saliva, e inmunoprecipitación de Histatina-1: (A) En primera instancia se tomaron muestras de saliva total de 5 donantes sanos. Las muestras fueron centrifugadas, se ajustó pH y se añadió inhibidores de proteasas y fosfatasas. (B) Posteriormente, las muestras fueron incubadas por 2 horas a 4°C con beads de proteína A-seferosa precubiertos con anticuerpos, ya sea contra Histatina-1 o contra HSP90 (IgG control). (C) Terminado el periodo de incubación, el material fue centrifugado para separar un pellet (inmunoprecipitado, IPP) y un sobrenadante inmunodepletado (SUP), los cuales fueron analizados por Western blot, o utilizados en los ensayos de trans migración en Cámara Boyden.

De acuerdo con el protocolo descrito, en la mayoría de los casos, Histatina-1 se encontró enriquecida en la fracción *pellet* (inmunoprecipitado, IPP), mientras que su contenido se encontró disminuido en la fracción sobrenadante inmunodepletado (SUP, [Figura 14](#)).

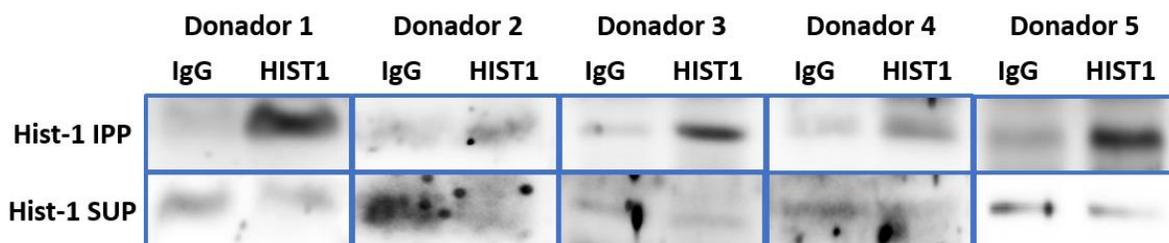


Figura 14 | Análisis por Western blot del ensayo de inmunoprecipitación. Las fracciones *pellet* inmunoprecipitado (IPP) y sobrenadante inmunodepletado (SUP), obtenidas de 5 donantes, según lo descrito en la Figura 13 fueron analizadas por Western blot, usando un anticuerpo policlonal anti-Histatina-1 (estandarizado en la Figura 6). La figura muestra imágenes representativas para cada una de las condiciones.

De esta forma, las fracciones sobrenadante inmunodepletado de Histatina-1, y sobrenadante control (IgG) fueron utilizadas para los ensayos de trans migración de células EA.hy926 en Cámara Boyden ([Tabla 1](#)). En base a estos ensayos, se observó que el sobrenadante control (IgG) estimuló la migración celular en comparación al buffer saliva, con una fluctuación de entre 2 y 8 veces, según la procedencia de la muestra del donante de saliva. Importantly, en 4 de los 5 casos se observó una disminución de la migración celular inducida por saliva, cuando ésta fue inmunodepletada de Histatina-1 ([Tabla 1](#)).

Donador	Buffer Saliva	Saliva total + Control IgG	Saliva total + anti-Hist1
1	1.0 ± 0.6	3.3 ± 0.5	1.7 ± 1.3
2	1.0 ± 1.0	2.0 ± 0.9	1.5 ± 0.6
3	1.0 ± 0.6	5.5 ± 2.4	3.5 ± 1.3
4	1.0 ± 0.6	8.4 ± 1.3	0.8 ± 0.4
5	1.0 ± 0.7	7.0 ± 1.1	1.0 ± 0.5

Tabla 1 | Efecto de la inmunodepleción de Histatina-1 en la migración celular inducida por saliva. Los sobrenadantes inmunodepletados descritos en la Figura 14 fueron utilizados en ensayos de trans migración en Cámara Boyden, según lo esquematizado en la Figura 13. Los datos numéricos representan las veces de aumento de la migración celular, con respecto al control buffer saliva, realizado para cada condición “donante”. Los datos corresponden a experimentos independientes, realizados por donante, en cuadruplicado.

OBJETIVO ESPECÍFICO 5. EVALUAR VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ANGIOGÉNICAS ESTIMULADAS POR HISTATINA-1 EN CÉLULAS ENDOTELIALES

Evaluación del eje RIN2/Rab5/Rac1

Estudios recientes han demostrado que el eje de señalización intracelular “RIN2/Rab5/Rac1” es fundamental para la adhesión, migración y reorganización estructural de células endoteliales, eventos esenciales en la angiogénesis (Sandri y col. 2012; Fernandez-Borja 2012). En vista de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, quisimos evaluar la participación de esta vía de señalización en los efectos inducidos por Histatina-1, como se indica en la **Figura 15**:

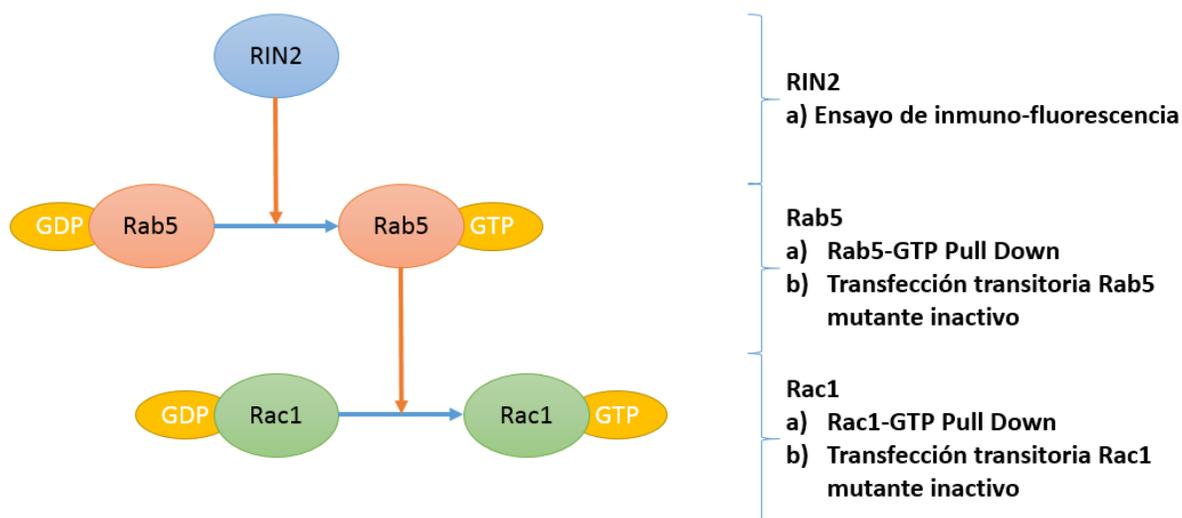


Figura 15 | Esquema de trabajo para la evaluación del eje de señalización “RIN2/Rab5/Rac1”. El esquema indica las diferentes estrategias experimentales para evaluar la localización del activador de Rab5, RIN2 (inmunofluorescencia), la activación de Rab5 (niveles de Rab5-GTP mediante pull-down y transfección con la mutante inactiva Rab5/S34N), y la activación de Rac1 (niveles de Rac1-GTP mediante pull-down y transfección con la mutante inactiva Rab5/T17N).

Evaluación de RIN2

RIN2 es un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF), que promueve la activación funcional de Rab5, evento que se ha visto asociado a su acumulación en endosomas tempranos, como evento inicial en la migración de células endoteliales (Sandri y col. 2012). De esta forma, evaluamos la localización de RIN2 en células EA.hy926, ya sea en condiciones no tratadas o estimuladas con Histatina-1, mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Como se puede ver en la **Figura 16**, la presencia de Histatina-1 aumentó la localización de RIN2 hacia endosomas tempranos, dado por el aumento en la co-localización con el marcador de endosomas tempranos EEA1 (coeficientes de Mander's de 0,39 v/s 0,56, para las condiciones control e Histatina-1, respectivamente). Lo anterior sugiere que RIN2 podría estar involucrado en las respuestas inducidas por Histatina-1.

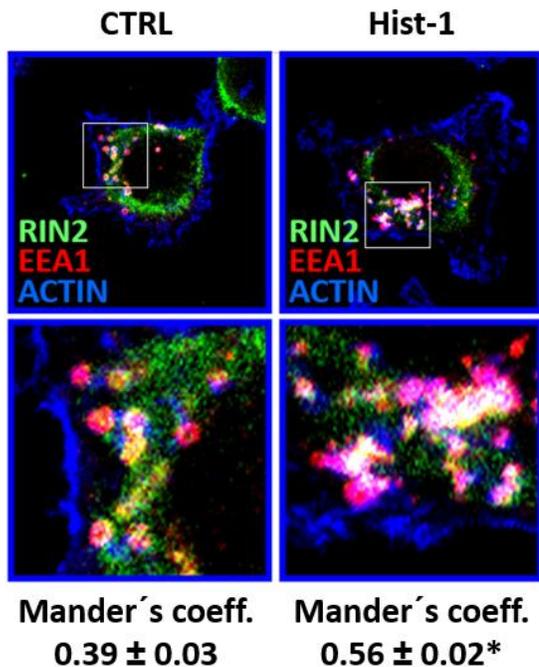


Figura 16 | Histatina-1 aumenta la localización endosomal de RIN2 en células EA.hy926. Células EA.hy926 fueron crecidas en cubreobjetos y tratadas con Histatina-1 por una hora, para posteriormente ser fijadas y tratadas para inmunofluorescencia, usando anticuerpos específicos contra RIN2 y EEA1, así como la sonda falloidin para detectar filamentos de actina. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes, en donde los paneles superiores corresponden a la imagen de superposición de colores, y los paneles inferiores corresponden a un aumento digital de la región de interés demarcada con un cuadro en los paneles superiores. Los datos numéricos corresponden a los coeficientes de Mander's, obtenidos de 3 experimentos independientes (promedio ± error estándar). * $P < 0,05$.

Evaluación de Rab5

Ya evaluado RIN2 como potencial mediador de la vía de señalización desencadenada por Histatina-1, se prosiguió a evaluar la participación de Rab5, como principal efecto de Rab5 (Figura 15). Para ello, se realizó un ensayo de precipitación por afinidad (*pull-down*), el cual permite estimar los niveles relativos de Rab5-GTP, comparando células endoteliales EA.hy926 no tratadas o estimuladas con Histatina-1. Como se puede ver en la Figura 17A, Histatina-1 produjo un aumento de 2 veces en la fracción activa de Rab5 (unida a GTP), sin alterar la expresión total de la proteína. Este resultado sugiere que Rab5 participa en los efectos mediados por Histatina-1. Para evaluar esta posibilidad, se transfectaron células EA.hy926 con una mutante inactiva de Rab5 (pEGFP-Rab5/S34N) o un vector vacío como control (pEGFP-C1, EV), para posteriormente someterlas a un ensayo de trans migración en Cámara Boyden, en ausencia o presencia de Histatina-1. Los resultados indican que la condición transfección control (EV) no presentan una alteración en su capacidad migratoria, de tal manera que Histatina-1 produjo un aumento sustancial de la migración. Sin embargo, en las células transfectadas con la mutante inactiva de Rab5, se observó un menor aumento en la migración celular frente a la exposición a Histatina-1 (Figura 17B).

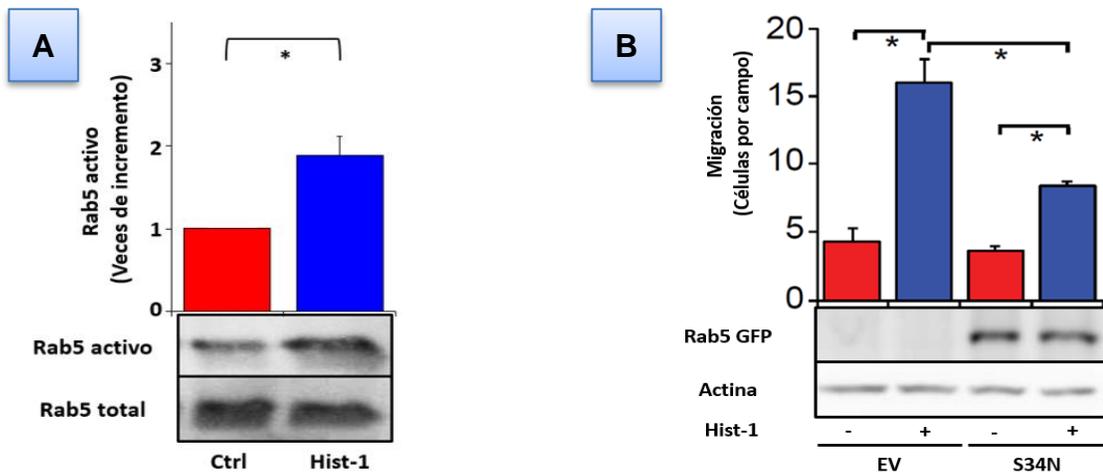


Figura 17 | Histatina-1 y Rab5: (A) Medición de la actividad de Rab5 en células EA.hy926 tratadas con Histatina-1, mediante ensayo de pull-down. El Western blot corresponde a una imagen representativa para la detección de Rab5 activo y total, mientras que la gráfica corresponde los niveles relativos de Rab5-GTP normalizados con Rab5 total, obtenidos por análisis densitométrico. (B) La participación de Rab5 en los efectos mediados por Histatina-1 fue evaluada por transfección del vector vacío (pEGFP-C1) o la mutante inactiva de Rab5 (pEGFP-Rab5/S34N) y posterior ensayo de trans migración en Cámara Boyden, en presencia o ausencia de Histatina-1. Se muestra un Western blot representativo para la expresión de GFP-Rab5 y la gráfica corresponde a la migración celular (células por campo) en cada condición. Tanto para las gráficas de (A) y (B), los datos corresponden al promedio de 4 experimentos independientes (promedio \pm error estándar). * $P < 0,05$.

Evaluación de Rac1

Dado que la activación de Rab5 conlleva a la activación consecuente de otra GTPasa pequeña, Rac1 (Sandri y col. 2012; **Figura 15**), se prosiguió con el análisis de los niveles de Rac1-GTP frente a la estimulación con Histatina-1. Mediante ensayos de pull-down para Rac1, se observó que Histatina-1 indujo un aumento de más de 4 veces en la fracción activa de Rac1, en comparación a la condición control EA.hy926 no tratadas (**Figura 18A**). Con una estrategia similar a la descrita para Rab5, a continuación, se procedió a evaluar la relevancia de Rac1 en los efectos mediados por Histatina-1, en ensayos de transfección con una mutante inactiva de Rac1 (pEGFP-Rac1/T17N). Los resultados indicaron que la transfección con la mutante inactiva de Rac1 inhibió por completo la migración celular inducida por Histatina-1, situación contraria a lo que ocurrió en la condición control vector vacío, en donde Histatina-1 indujo un aumento significativo en la migración celular (**Figura 18B**).

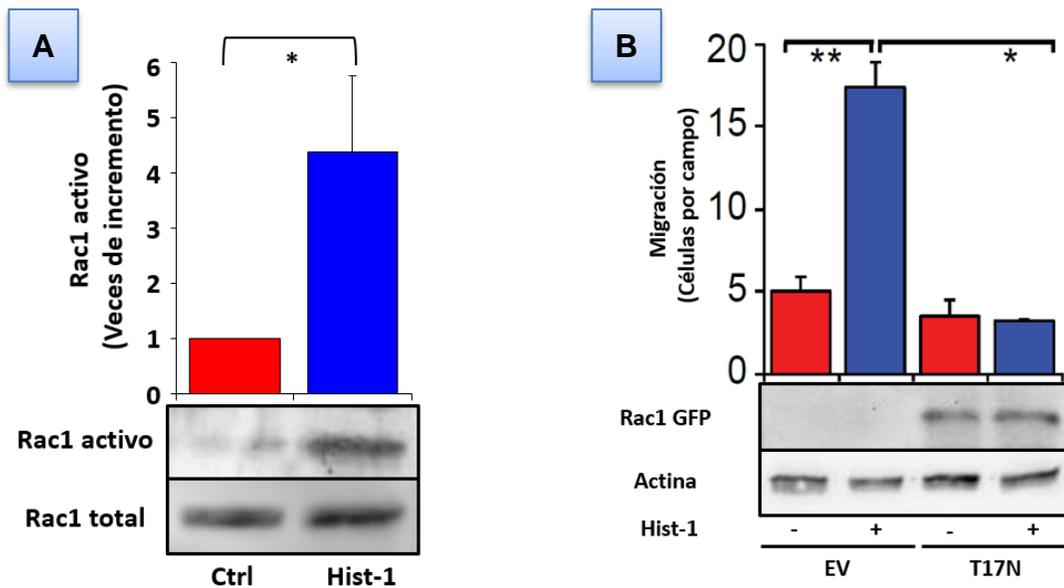


Figura 18 | Histatina-1 y Rac1: (A) Medición de la actividad de Rac1 en células EA.hy926 tratadas con Histatina-1, mediante ensayo de pull-down. El Western blot corresponde a una imagen representativa para la detección de Rac1 activo y total, mientras que la gráfica corresponde los niveles relativos de Rac1-GTP normalizados con Rac1 total, obtenidos por análisis densitométrico. (B) La participación de Rac1 en los efectos mediados por Histatina-1 fue evaluada por transfección del vector vacío (pEGFP-C1) o la mutante inactiva de Rac1 (pEGFP-Rac1/T17N) y posterior ensayo de trans migración en Cámara Boyden, en presencia o ausencia de Histatina-1. Se muestra un Western blot representativo para la expresión de GFP-Rac1 y la gráfica corresponde a la migración celular (células por campo) en cada condición. Tanto para las gráficas de (A) y (B), los datos corresponden al promedio de 4 experimentos independientes (promedio \pm error estándar). * $P < 0,05$.

Relación entre Rab5 y Rac1 frente al tratamiento con Histatina-1

Ya establecida la participación de Rab5 y Rac1 en los efectos mediados por Histatina-1, se procedió a determinar la secuencialidad entre Rab5 y Rac1, tal como se plantea en el eje “RIN2-Rab5-Rac1” (Sandri y col. 2012; **Figura 15**). Para ello, se procedió a transfectar células EA.hy926 con una mutante inactiva de Rab5 (pEGFP-Rab5/S34N) o un vector vacío (pEGFP-C1, EV), para posteriormente evaluar la fracción activa de Rac1, en ausencia o presencia de Histatina-1. Los resultados expuestos en la **Figura 19** muestran que el tratamiento con Histatina-1 aumenta de manera significativa los niveles de Rac1-GTP en células EA.hy926 control (EV), mientras que la transfección con la mutante inactiva de Rab5, inhibió el aumento en la fracción activa de Rac1 inducida por Histatina-1. Lo anterior establece una línea secuencial entre Rab5-Rac1, frente a la exposición de células endoteliales a Histatina-1.

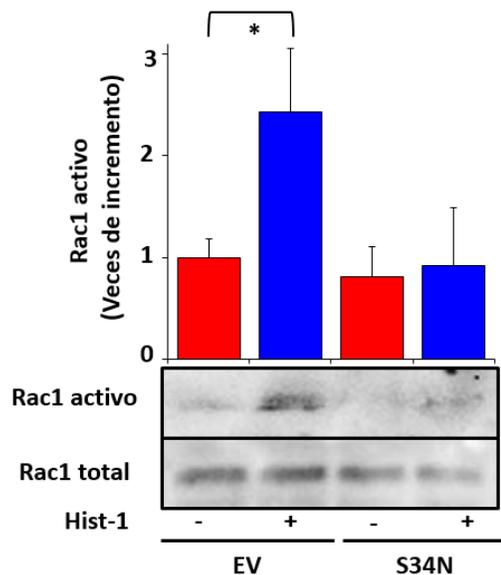


Figura 19 | Secuencialidad entre Rab5 y Rac1: La participación de Rab5 en la activación de Rac1 inducida por Histatina-1 fue evaluada por transfección del vector vacío (pEGFP-C1) o la mutante inactiva de Rab5 (pEGFP-Rab5/S34N) y posterior ensayo de pull-down para Rac1-GTP, en presencia o ausencia de Histatina-1. Se muestra un Western blot representativo para los niveles de Rac1 activo (Rac1-GTP) y total, y la gráfica corresponde a los niveles relativos de Rac1-GTP en relación a Rac1 total, obtenidos por análisis densitométrico de 6 experimentos independientes (promedio \pm error estándar). * $P < 0,05$.

Evaluación de ERK1/2 y FAK

Las moléculas de señalización ERK1/2 y FAK han sido descritas como esenciales para la migración de células endoteliales y el proceso de angiogénesis (Lamallice y col. 2007). Por esta razón, se decidió evaluar la actividad de ambas proteínas en células endoteliales expuestas a Histatina-1. En ambos casos se estimularon células EA.hy926 con Histatina-1 por distintos períodos de tiempo, y posteriormente se homogenizaron las células y se realizaron análisis de Western blot con anticuerpos primarios dirigidos contra ERK1/2, ERK1/2 activo (fosforilado), FAK, y FAK activo (fosforilado en Y-397). Como se puede observar en la **Figura 20**, el tratamiento con Histatina-1 produjo una activación bifásica de ERK1/2, observándose un *peak* temprano (5 minutos) y un *peak* tardío (60 minutos). Contrariamente a ERK1/2, el tratamiento de células EA.hy926 no produjo fluctuaciones en la activación de FAK en ninguna de las ventanas de tiempo evaluadas (**Figura 21**).

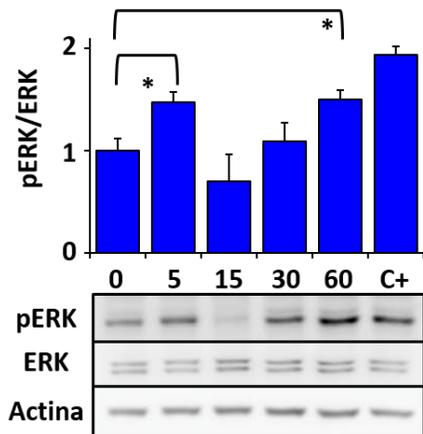


Figura 20 | Histatina-1 y ERK1/2. Células EA.hy926 fueron expuestas a Histatina-1 por diferentes períodos de tiempo en medio libre de suero (0, 5, 15, 30 y 60 minutos), y posteriormente se obtuvieron homogenizados de cada muestra. Como control positivo (C+), se utilizó un extracto de células EA.hy926 tratadas por 60 minutos con suero. Los niveles de ERK1/2 total y ERK1/2 fosforilado, así como de actina (control de carga) fueron evaluados por Western blot. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar). * $P < 0,05$.

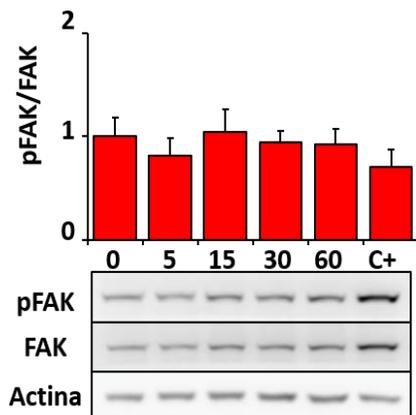


Figura 21 | Histatina-1 y FAK. Células EA.hy926 fueron expuestas a Histatina-1 por diferentes períodos de tiempo en medio libre de suero (0, 5, 15, 30 y 60 minutos), y posteriormente se obtuvieron homogenizados de cada muestra. Como control positivo (C+), se utilizó un extracto de células EA.hy926 tratadas por 60 minutos con suero. Los niveles de FAK total y FAK fosforilado, así como de actina (control de carga) fueron evaluados por Western blot. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar). * $P < 0,05$.

6. DISCUSIÓN

La reparación de heridas es un proceso de capital importancia para la mantención de la integridad de nuestros tejidos (Orsted y col. 2011). Por lo mismo es un proceso altamente regulado en su secuencialidad y duración (Guon y Di Pietro 2010); secuencialidad que es mantenida en la totalidad del cuerpo (Sciubba y col. 1978 – Walsh y col. 1996), aunque eso no significa que el proceso de reparación de heridas se presente con igual rapidez y calidad a lo largo de todo el cuerpo. Lo anterior ha sido demostrado principalmente al comparar la reparación de piel y mucosa oral (Glim y col. 2013). Ésta última ha demostrado poseer una capacidad de reparación mucho más rápida y con un resultado de mejor calidad (Hennicke 1950). Responder al cómo de estas diferencias no ha sido fácil, ya que responde a muchos factores, tales como: mayor rapidez en la migración y proliferación celular oral (Drukala y col. 2005 -Turabelidze y col. 2014 - Gilm y col. 2013), menor respuesta inflamatoria en mucosa oral (Spaderzka y col. 2003), mejor vascularización en mucosa oral (Cannady y col. 1993) y presencia de saliva (Brand y Veerman 2013). En referencia a ésta última, se asumía que la saliva influía de manera positiva en la reparación de heridas al aportar un ambiente húmedo que evitaría la desecación celular (Winter y Scales 1963), sin embargo y posteriormente se dio paso a un paradigma distinto, en donde se establecía a un conjunto de factores de crecimiento (EGF, NGF, FGF, VEGF) como los principales responsables de la propiedad estimuladora de la saliva en el cierre de heridas (Hutson y col. 1979). Sin embargo, el paradigma anterior presentaba ciertos inconvenientes: la principal evidencia que lo apoyaba derivaba de modelos murinos, modelos en los cuales se sabe que la concentración de estos factores sobrepasa por mucho a la concentración de éstos mismos en saliva humana (Brand y Veerman 2013). Además, no hay una correlación entre la concentración de algunos de estos factores, como EGF en saliva humana y la capacidad de ésta para estimular células en el ensayo de cierre de heridas *in vitro* (Oudhoff y col. 2008).

No obstante, el trabajo de Oudhoff y col. derribó aspectos de este paradigma, al demostrar que Histatina-1, un péptido implicado hasta ese entonces en la

Sin embargo, este no es el único trabajo que demuestra que Histatina-1 puede tener un efecto sobre células endoteliales. En paralelo a la ejecución de este trabajo de tesis, van Dijk y col., demostraron en un artículo que Histatina-1 promueve la expansión de células endoteliales, y además estimula la adhesión célula-célula, disminuyendo la permeabilidad de la barrera endotelial (van Dijk y col. 2017^b). Los hallazgos encontrados en este trabajo de tesis, sumados a los estudios de van Dijk, llevan a plantear las siguientes interrogantes, ¿cómo puede Histatina-1 promover la adhesión célula-célula, célula-matriz extracelular y la migración celular endotelial, siendo todos estos procesos de alguna manera diferentes? La verdad es que actualmente se sabe que estos procesos comparten muchas vías de señalización (*crosstalk*), las cuales se regulan de manera precisa entre sí, impactando de manera contexto-específico las diferentes respuestas celulares (Weber y col. 2011). Tentativamente, podríamos plantear un modelo por el cual se podría responder, al menos parcialmente a esta pregunta. Nuestros hallazgos indican que los efectos de Histatina-1 descansan en un eje que culmina en la activación de Rac1. Esta GTPasa tiene un rol fundamental en la polimerización de los filamentos de actina, lo cual se traduce en la formación de protrusiones de membrana, como *lamellipodios* (Ehrlich y col. 2002). Estas estructuras son necesarias en la formación de un frente de avance y de nuevas adhesiones célula-matriz, mediadas por integrinas (Ridley y col. 2003). Sin embargo, estas protrusiones iniciadas por Rac1, también podrían promover la formación de adhesiones célula-célula, lo cual es sustentado por el hallazgo de un aumento local de cadherina endotelial (VE-cadherina, proteína de adhesión celular (van Dijk y col. 2017^b)).

Otra GTPasa descrita en este trabajo de tesis es Rab5, un regulador maestro en la dinámica de endosomas tempranos (Torres 2014), la cual al ser activada por Histatina-1, permite plantear la posibilidad de que impacte en el tráfico intracelular de VE-cadherina, algo propuesto previamente por otros autores (Yang y col. 2015) regulando la ubicación superficial de esta proteína de adhesión e impactando en la adhesión célula-célula. Por otra parte, respecto a la adhesión célula-matriz, la activación de Rab5 por Histatina-1 también podría tener un sustento mecánico, en donde trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que Rab5 regula

la adhesión mediada por integrinas y adhesiones focales, acelerando su recambio (Mendoza y col. 2013; Mendoza y col. 2017). Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para evaluar estas posibilidades. Por último, en este estudio se mostró una activación de ERK1/2 frente a Histatina-1, y esto podría también tener relevancia en el contexto de la migración celular endotelial, ya que se ha demostrado que esta kinasa promueve el desensamble de las adhesiones focales, efecto mediado por la proteasa calpaína (Huang y col. 2004)

Como se puede ver, responder en profundidad la pregunta anterior no es simple, de tal manera que se necesitan más estudios para diseccionar de manera certera los mecanismos de acción de Histatina-1; pero de momento se puede concluir que Histatina-1 desencadena un subconjunto de vías que posiblemente se intersectan, las cuales llevan a un aumento de la adhesión, extensión y migración celular endotelial, teniendo además, un efecto nulo en la proliferación, hallazgo que concuerda con lo observado en otros modelos celulares, como queratinocitos y fibroblastos (Oudhoff y col. 2008; Oudhoff y col. 2009 ^{b)})

Una vez determinados los efectos mediados por Histatina-1 en la adhesión, extensión y migración endotelial, se evaluó un paso más allá en la cascada de eventos que llevan a la angiogénesis, específicamente en la re-estructuración de las células endoteliales (morfogénesis vascular en la **Figura 5**). Para tal caso, evaluamos *in vitro* la formación de estructuras poligonales, que asemejan a los capilares. En este caso, Histatina-1 fue capaz de aumentar la formación de estas estructuras tipo capilares, de manera similar a como lo hizo VEGF, un reconocido factor pro-angiogénico. De cierta manera este resultado era esperable, teniendo en cuenta los efectos de Histatina-1 sobre la adhesión célula-célula (van Dijk y col. 2017b), célula-matriz y migración endotelial (Torres y col. 2017b). Lo sorprendente radica en la similitud de los resultados obtenidos con Histatina-1 y VEGF.

Lamentablemente, el ensayo anterior tiene limitaciones propias de un modelo en ambiente controlado *in vitro*, de tal manera que no permite asegurar que Histatina-1 tenga un efecto real a nivel fisiológico. Por ende, el siguiente paso sería avanzar

hacia un modelo *in vivo*. Aún cuando no fue un objetivo de este trabajo evaluar los efectos de Histatina-1 en un modelo *in vivo*, de igual manera quisiera mostrar en este apartado los resultados, obtenidos por nuestro laboratorio, en el contexto de una colaboración con el laboratorio de la Dra. Verónica Palma (Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). Específicamente, esta colaboración buscó establecer el efecto *in vivo* de Histatina-1 en el modelo de Membrana Corioalantoidea de Pollo (Chick CAM), de tal manera que este relato sea contado de manera más íntegra (**Figura 23**).

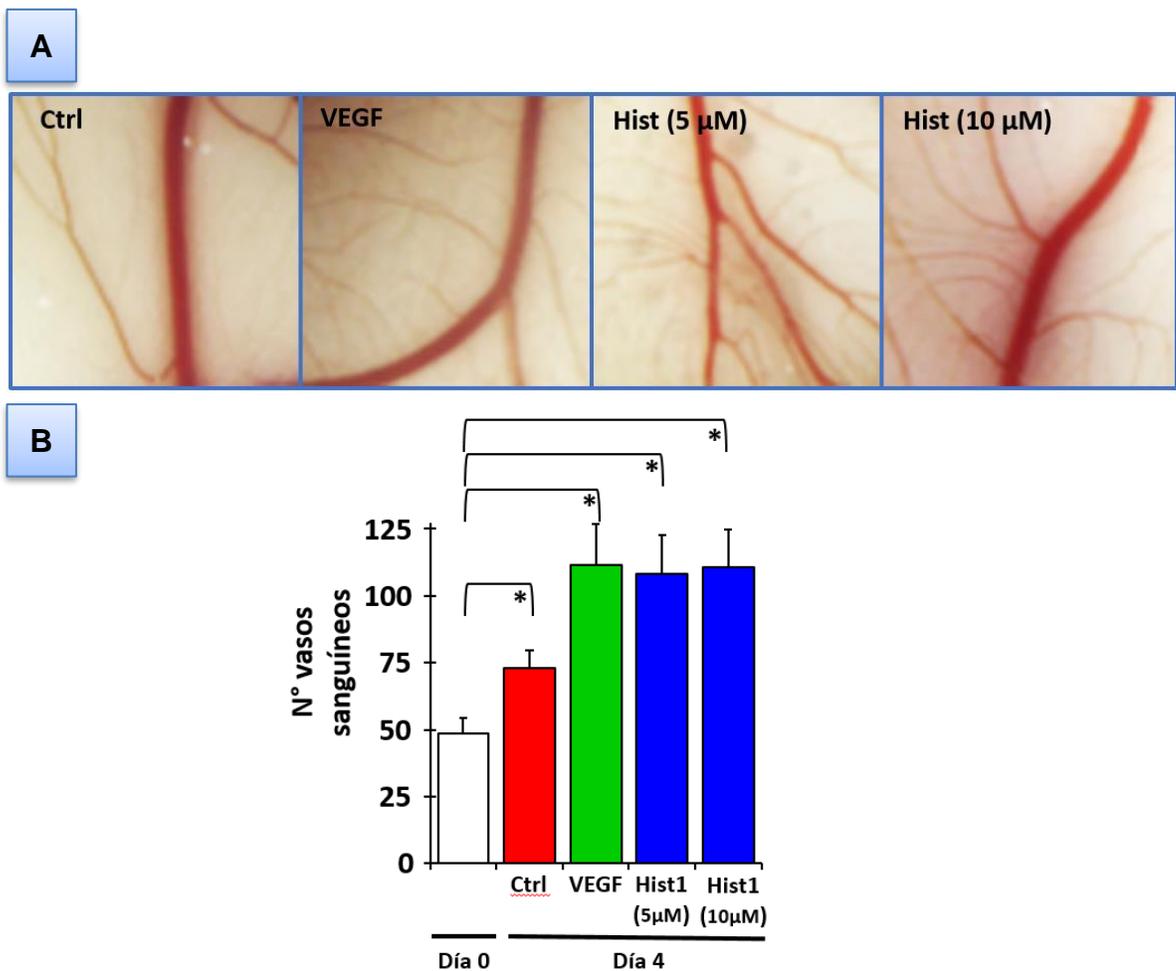


Figura 23 | Efecto *in vivo* de Histatina-1: Para evaluar el efecto de Histatina-1 en un modelo *in vivo*, se utilizó el ensayo de la Membrana Corioalantoidea de Pollo (*Chick-CAM assay*). En **(A)**, se muestran imágenes representativas del ensayo realizado en embriones de pollo de 7 días (definido como condición "día 0"), y su medición posterior frente a las siguientes condiciones por 4 días adicionales: control vehículo (agua Sander's), VEGF 10ng/ml (control positivo), Histatina-1 5 y 10 μM. **(B)** Cuantificación del número de vasos sanguíneos formados. Se realizaron 3 experimentos independientes (promedio ± error estándar). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Como se puede ver en la **Figura 23**, Histatina-1 tiene la capacidad de fomentar la formación de vasos sanguíneos, de manera similar a como lo hace VEGF, un potente factor pro-angiogénico. Lo anterior, sumado a los datos aportados por este trabajo de investigación, permite establecer a Histatina-1 como un nuevo factor pro-angiogénico.

En consecuencia, la evidencia actual permite la proyección de Histatina-1 como un coadyuvante en la reparación de heridas de diferente índole, debido a la capacidad que tiene de promover el fenómeno de re-epitelialización (Oudhoff y col. 2009a) y angiogénesis, todo esto a concentraciones fisiológicas (10 μ M) (Castagnola y col. 2002). A lo anterior se suma la inocuidad del péptido (Oudhoff y col. 2009a), estabilidad frente a ambientes inflamatorios (en específico, su forma química sintética y ciclada) (Boink y col. 2016) y capacidad de ser enlazado con otros agentes antimicrobianos sin perder sus funciones pro-migratorias (Pal y col. 2014)

Por último, es importante destacar que el presente trabajo de tesis entrega, por primera vez, evidencia directa de que la saliva humana ejerce un efecto pro-migratorio en células endoteliales, y más aún, que este efecto depende de Histatina-1. Si se mira con mayor detención, este es el primer trabajo que utiliza saliva humana total **no estimulada**, a diferencia de la mayoría de los estudios, que utilizan saliva estéril obtenida de la glándula parótida para evaluar migración (Oudhoff y col. 2008; Oudhoff y col. 2009b) Teniendo en cuenta la presencia de proteasas en la saliva humana que afectan a Histatina-1 (Sun y col. 2009; Campese y col. 2009) es posible preguntarse ¿cómo es posible llegar a tener actividad biológica frente a estas condiciones? Un estudio realizado por Sun y col. 2009, por medio de diferentes aproximaciones, demostró que las proteasas presentes en la saliva humana proteolizan a Histatina-1 sin afectar al dominio responsable de su actividad pro-migratoria (usando queratinocitos orales). Además, en este mismo estudio, se estableció de manera teórica que la degradación de Histatina-1 (por parte de las proteasas salivales) lleva a una estabilización de su concentración en “estado estacionario” de 5.1 μ M (Sun y col. 2009) concentración capaz de promover la angiogénesis en el modelo *in vivo* (**Figura 23**). Toda esta evidencia permite

explicar, en parte cómo la saliva humana total puede ejercer un efecto pro-migratorio potente en células endoteliales. Finalmente, y a pesar de la evidencia mostrada en este estudio, no podemos establecer a ciencia cierta que Histatina-1 participe efectivamente y de manera fisiológica en el proceso de angiogénesis a nivel de mucosa oral. Lo anterior no quita que este péptido tenga un gran potencial en el campo de la ingeniería y reparación tisular, para posteriormente impactar en la práctica clínica. De hecho, son muchas las aplicaciones potenciales que han sido propuestas para este péptido (resumidas en la **Figura 24**), en áreas como la farmacología antimicrobiana, implantología, terapias de integración ósea, y los hallazgos recientes en el contexto de la angiogénesis (Torres y col. 2017b; van Dijk y col. 2017a) y como factor de pronóstico tumoral (Yagushi y Kawakami 2012)

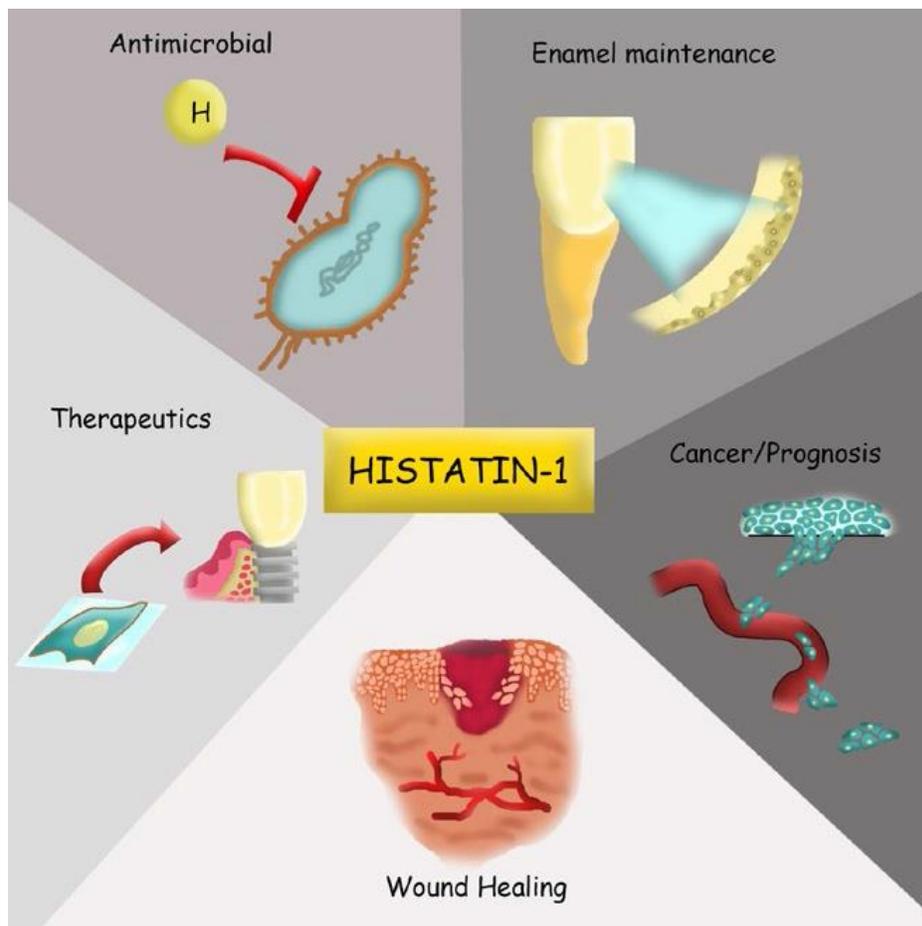


Figura 24 | Histatina-1, actividades biológicas y aplicaciones potenciales. La figura entrega un resumen de las funciones definidas como “canónicas”, entre las cuales se cuentan su actividad antimicrobiana, homeostasis de la película salival adquirida y estructura del esmalte. Más allá de estas funciones, Histatina-1 ha sido documentada como un factor pro-migratorio, mejorando la reparación de heridas, así como la adhesión celular en implantes de titanio (van Dijk y col. 2017a). Por otro lado, Histatina-1 también ha sido postulada como un posible marcador tumoral (Yagushi y Kawakami 2012), aumentando sus posibilidades en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

7. CONCLUSIÓN

En el presente estudio, el péptido Histatina-1 ha demostrado favorables resultados en la estimulación de la adhesión y migración endotelial, eventos que son cruciales para proceso de re-estructuración endotelial, teniendo un fuerte impacto a su vez en el fenómeno de la angiogénesis. Toda esta evidencia permite plantear a Histatina-1 como un factor pro-angiogénico con proyecciones en el campo de la reparación tisular.

Además, se mostró por primera vez evidencia directa de que la saliva humana tiene un efecto pro-migratorio en células endoteliales, y que este efecto depende en parte de Histatina-1. No obstante, se necesitan más investigaciones para poder establecer la participación fisiológica de Histatina-1 en la angiogénesis a nivel de mucosa oral.

Por último, se pudo establecer la mediación del eje de señalización “RIN2/Rab5/Rac1” y ERK1/2 en los efectos desencadenados por Histatina-1. Sin embargo, todavía falta investigación para diseccionar de mejor manera los mecanismos de acción de este péptido, de tal manera que su potencial pueda explotarse mejor.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad Mansur, Marco Piludu, Frank G. Oppenheim, Eva J. Helmerhorst, and Arthur R. Hand. (2004). Immunocytochemical Localization of Histatins in Human Salivary Glands. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 52: 361-370.

Aranda Evelyn, Owen Gareth. (2009). A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol Res*. 42: 377-389.

Azen EA, Hellekant G, Sabatini LM, Warner TF. (1990). mRNAs for PRPs, statherin, and histatins in von Ebner's gland tissues. *J Dent Res*. 69: 1724-30.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 16: 585-601

Beaudry V, Rebecca A, Ihrie, Suzanne B, R. Jacobs, Bichchau Nguyen, Navneeta Pathak, Eunice Park, and Laura D. Attardi. (2010). Loss of the Desmosomal Component Perp Impairs Wound Healing In Vivo. *Dermatol Res Pract*.

Bodner L, Dayan D, Oberman M, Hirshberg A, Tal H. (1992). Healing of experimental wounds in sialadenectomized rat. *J Clin Periodontol*. 19:345-7.

Bodner L, Dayan D, Pinto Y, Hammel I. (1993). Characteristics of palatal wound healing in desalivated rats. *Arch Oral Biol*. 38:17-21.

Boink MA, Roffel S, Nazmi K, van Montifrans, Bolscher, Gefen A, Veerman E, Gibbs S. (2016). The influence of chronic wounds extract on inflammatory cytokine and histatin stability. *PLoS One*. 11 (3):e015261

Brand HS, Ligtenberg AJ, Veerman EC. (2014) Saliva and wound healing. *Monogr Oral Sci*. 24:52-60.

Broughton G, Janis JE, Attinger CE. (2006) Wound healing: An overview. *Plast Reconstr Surg*. 117:1e-S-32e-S.

Bryan BA, D'Amore PA. (2007). What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 64: 2053-65.

Campese Melanie, Sun Xiuli, Bosch Jos, Oppenheim Frank, Helmerhorst Eva. (2009) Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment. *Arch Oral Biol*. 54: 345-353

Canady JW, Johnson GK, Squier CA. (1993). Measurement of blood flow in the skin and oral mucosa of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) using laser

- Doppler flowmetry. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*. 106(1):61-3.
- Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 6: 389-395.
- Carmeliet P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 9:653-660.
- Castagnola M., Cabras T., Denotti G., Fadda M.B., Gambarini G., Lupi A. y col. (2002) Circadian Rhythms of histatin 1, histatin 3, histatin 5, statherin and uric acid in whole human saliva secretion. *Biological Rhythm Research*. 33: 213-222
- Connolly John, Nandi Simpson, Lindsay Hewlett, Alan Hall. (2002) Rac1 Regulates Endothelial Morphogenesis and Capillary Assembly. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 2474–2485.
- Dahlback, B. (2005) Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of internal medicine* 257: 209-223.
- Drukala Justyna, Zarzecka Joanna, Gojniczek Katarzyna, Waligorska Agnieszka, Zapala Jan, Korohoda Włodzimierz. (2005) Comparison of proliferation and motile activity between human keratinocytes isolated from skin and oral mucosa. *Folia biologica (Kraków)*. 53:21-28.
- Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ. (2002). Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell*. 3(2):259-70.
- Eming Sabine, Bent Brachvogel, Teresa Odoriso, Manuel Koch. (2007). Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem*. 42: 115-170.
- Garlick JA, Parks WC, Welgus HG, Taichman LB. (1996) Re-epithelialization of human oral keratinocytes in vitro. *J Dent Res*. 75: 912-8.
- Garret Tiana, Jaap D. Van Buul, Keith Burridge. (2007). VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp Cell Res*. 313: 3285–3297.
- Glim Judith E., Marjolein van Egmond, Frank B. Niessen, Vincent Everts, Robert H. J. Beelen. (2013) Detrimental dermal wound healing: What can we learn from the oral mucosa?. *Wound Rep Reg*. 21: 648–660.
- Guon S., L.A. DiPietro. (2010) Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res*. 89:219-229.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*. 453: 314-21.

Hannu Larjava. (2012). Oral wound healing: An Overview. In: Oral wound healing: Cell biology and clinical management. Hannu Larjava. Editorial: John Wiley & Sons inc. Páginas: 1-9.

Hennicke A. (1950). The favourable tendency of the mouth to heal. *Dent Rundsch.* 5: 18-20.

Huang C, Jacobson K, Schaller MD. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 117(Pt 20):4619-28

Hutson, J.M., Niall, M., Evans, D., y Fowler, R. (1979). Effect of salivary glands on wound contraction in mice. *Nature.* 279: 793-795.

Keswani Sundeep, Swathi Balaji, Louis D. Le, Alice Leung, Jignesh K. Parvadia, Jason Frischer. (2013) Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen.* 21: 554–562.

Kuroki Shinsuke, Yokoo Satoshi, Terashi Hiroto, Hasegawa Masumi, Komori Takahide. (2009) Epithelialization in oral mucous wound healing in terms of energy metabolism. *Kobe J. Med. Sci.* 55: E5-E15

Lamalice, L., Le Boeuf, F., and Huot, J. (2007) Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 100: 782-794

Larjava H, Salo T, Haapasalmi K, Kramer RH, Heino J. (1993). Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest.* 92: 1425-35.

Laurens N, Koolwijk P, de Maat MPM. (2006) Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost.* 4: 932–9.

Macarak, E. J., and Howard, P. S. (1983) Adhesion of endothelial cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Physiol.* 116(1):76-86

Mak K, Manji A, Gallant-Behm C, Wiebe C, Hart DA, Larjava H, Häkkinen L. (2009) Scarless healing of oral mucosa is characterized by faster resolution of inflammation and control of myofibroblast action compared to skin wounds in the red Duroc pig model. *J Dermatol Sci.* 56:168-80.

María Elsa Gómez de Ferraris, Adriana Arriaga (2009). Glandulas salivales. En: Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. María Elsa Gómez de Ferraris, Antonio Campos Muñoz. Editorial Panamericana. Páginas: 153-187.

Mathews SA, Kurien BT, Scofield RH. (2008). Oral manifestations of Sjögren's syndrome. *J Dent Res.* 87(4):308-18.

Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. (2014). Histatins: salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications. *FEBS J.* 281:657-72.

Mendoza P, Ortiz R, Díaz J, Quest AF, Leyton L, Stupack D, Torres VA. (2013). Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J Cell Sci.* 1:3835-47.

Messana I, Cabras T, Iavarone F, Manconi B, Huang L, Martelli C, Olianias A, Sanna MT, Pisano E, Sanna M, Arba M, D'Alessandro A, Desiderio C, Vitali A, Pirolli D, Tirone C, Lio A, Vento G, Romagnoli C, Cordaro M, Manni A, Gallenzi P, Fiorita A, Scarano E, Calò L, Passali GC, Picciotti PM, Paludetti G, Fanos V, Faa G, Castagnola M. (2015). Chrono-proteomics of human saliva: variations of the salivary proteome during human development. *J Proteome Res.*14:1666-77.

Messana I, Cabras T, Pisano E, Sanna MT, Olianias A, Manconi B, Pellegrini M, Paludetti G, Scarano E, Fiorita A, Agostino S, Contucci AM, Calò L, Picciotti PM, Manni A, Bennick A, Vitali A, Fanali C, Inzitari R, Castagnola M. (2008). Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics.* 7:911-26

Oppenheim Frank, Xu Tao, McMillian Frederica, Levitz Stuart, Diamond Richard, Offner Gwynneth, Troxler Robert. (1988) Histatins a Novel Family of Histidine-rich Proteins in Human Parotid Secretion. *The Journal of Biological Chemistry.* 263: 7472-7477.

Oppenheim FG, Yang YC, Diamond RD, Hyslop D, Offner GD, Troxler RF. (1986) The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *J Biol Chem.* 261(3):1177-82.

Orsted Heather L., David Keast, Louise Forest- Lalande, Marie Françoise Mégie (2011). Basic principles of wound healing. *Wound Care Canada.* 9:4-12.

Oudhoff Menno, Jan Bolscher, Kamran Nazmi, Kakan Kalay, Wim van 't Hof, Arie Amerongen, Enno Veerman. (2008) Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB.* 22: 3805-3812.

Oudhoff Menno, Kim Kroeze, Kamran Nazmi, Petra van der Keijbus, Wim van 't Hof, Mar Fernandez-Borja y col. (2009) Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1000-fold. *FASEB.* 23: 3928-3935.

Oudhoff Menno, Petra van der Keijbus, Kim Kroeze, Kamram Nazmi, S. Gibbs, J. Bolscher y col. (2009) Histatins enhance wound closure with oral and non-oral cells. *J Dent Res.* 88: 846-850.

Padovan L, Segat L, Pontillo A, Antcheva N, Tossi A, Crovella S. (2010). Histatins in non-human primates: gene variations and functional effects. *Protein Pept Lett.* 17: 909-18.

Pammer J, Weninger W, Mildner M, Burian M, Wojta J, Tschachler E. (1998). Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary glands and is secreted in the saliva of healthy individuals. *J Pathol.* 186:186-91.

Piludu M, Lantini MS, Cossu M, Piras M, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Siqueira W, Hand AR. (2006). Salivary histatins in human deep posterior lingual glands (of von Ebner). *Arch Oral Biol.* 51:967-73.

Puxeddu L, Piliponsky A. M, Bachelet I, Levi-Schaffer F. (2003) Mast cells in allergy and beyond. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:1601-7.

Richards DW, MacPhail LA, Dekker N, Greenspan D, Greenspan JS, Lozada-Nur F, Regezi JA. (1996). Expression of laminin 5, fibronectin, and epithelium-associated integrins in recurrent aphthous ulcers. *J Dent Res.* 75:1512-7.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302(5651):1704-9.

Sabatini LM, Azen EA. (1989). Histatins, a family of salivary histidine-rich proteins, are encoded by at least two loci (HIS1 and HIS2). *Biochem Biophys Res Commun.* 160:495-502.

Sandri Chiara, Francesca Caccavari, Donatella Valdembri, Chiara Camillo, Stefan Veltel, Martina Santambrogio. (2012). The R-Ras/RIN2/Rab5 complex controls endothelial cell adhesion and morphogenesis via active integrin endocytosis and Rac signaling. *Cell Res.* 22: 1479–1501.

Sciubba James J., John P. Waterhouse, Julia Meyer (1978) A fine structural comparison of the healing of incisional wounds of mucosa and skin. *Journal of oral Pathology.* 7: 214-227.

Shah D, Ali M, Pasha Z, Jaboori AJ, Jassim SH, Jain S, Aakalu VK. (2016). Histatin-1 Expression in Human Lacrimal Epithelium. *PLoS One.* 11:e0148018.

Shaw Tanya, Paul Martin. (2009) Wound repair at a glance. *J. Cell Sci.* 122: 3209-3213.

Silva P, Mendoza P, Rivas S, Díaz J, Moraga C, Quest AF, Torres VA. (2016). Hypoxia promotes Rab5 activation, leading to tumor cell migration, invasion and metastasis. *Oncotarget.* 7:29548-62.

Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. (2010). Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 89: 626-30.

Sukdeb Pal, Yu Kyung Tak, Eunyong Han,^c Sabarinathan Rangasamy^a and Joon Myong Song. (2014). A multifunctional composite of an antibacterial higher-valent silver metallopharmaceutical and a potent wound healing polypeptide: a combined killing and healing approach to wound care. *New J Chem.* 38: 3889-3898.

Sullivan Tory, William H. Eaglstein, Stephen C. Davis, Patricia Mertz. (2001) The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* 9:66-76.

Sun X, Huang X, Tan X, Si Y, Wang X, Chen F, Zheng S. (2016). Salivary peptidome profiling for diagnosis of severe early childhood caries. *J Transl Med.* 14:240.

Sun Xiuli, Salih Erdjan, Oppenheim Frank, Helmerhorst Eva. (2009) Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. *FASEB.* 23: 2691- 2701

Szpaderska A.M., J.D. Zuckerman, L.A. DiPietro. (2003) Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res.* 82: 621-626.

Takano K, Malamud D, Bennick A, Oppenheim F, Hand AR. (1993) Localization of salivary proteins in granules of human parotid and submandibular acinar cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4:399-405.

Torres VA. (2014) Rab'ing tumor cell migration and invasion: focal adhesion disassembly driven by Rab5. *Cell Adh Migr.* 8(2):84-7.

Torres, P., Castro, M., Reyes, M. and Torres, V.A. (2017), Histatins, wound healing and cell migration. *Oral Dis.* (Dec 12) Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/odi.12816.

Torres P, Díaz J, Arce M, Silva P, Mendoza P, Lois P, Molina-Berrios A, Owen GI, Palma V, Torres V.A. (2017), The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis. *FASEB J.* 31(11): 4946-4958.

Troxler RF, Offner GD, Xu T, Vanderspek JC, Oppenheim FG. (1990) Structural relationship between human salivary histatins. *J Dent Res.* 69: 2-6.

Turabelidze A, Guo S, Chung AY, Chen L, Dai Y, Marucha PT, Luisa DiPietro.(2014). Intrinsic Differences between Oral and Skin Keratinocytes. *PLoS ONE*. 9: e101480.

Usui M. Jonathan N. Mansbridge, William G. Carter, Mayumi Fujita, and John E. Olerud. (2008) Keratinocyte Migration, Proliferation, and Differentiation in Chronic Ulcers From Patients With Diabetes and Normal Wounds. *J Histochem Cytochem*. 56: 687–696.

van Dijk IA, Ferrando ML, van der Wijk AE, Hoebe RA, Nazmi K, de Jonge WJ, Krawczyk PM, Bolscher JGM, Veerman ECI, Stap J. (2017). Human salivary peptide histatin-1 stimulates epithelial and endothelial cell adhesion and barrier function. *FASEB J*. 31(9):3922-3933

van Dijk Irene, A.F. Beker, W. Jellema, K. Nazmi, G. Wu, D. Wismeijer y col. (2017). Histatin-1 enhances cell adhesion to titanium in an implant integration model. *J Den Res*. 96:430-436.

van Dijk, Kamran Nazmi, Jan Bolscher, Enno Veerman, Jan Stap. (2015) Histatin-1, a histidine-rich peptide in human saliva, promotes cell-substrate and cell-cell adhesion. *FASEB*. 29: 3124-3132.

vanderSpek JC, Wyandt HE, Skare JC, Milunsky A, Oppenheim FG, Troxler RF. (1989). Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs. *Am J Hum Genet*. 45:381-7.

Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 93: 327-358.

Vitorino Rui, Maria João C. Lobo, José Ramos Duarte, António J. Ferrer-Correia, Pedro M. Domingues, Francisco M. L. Amado. (2005) The role of salivary peptides in dental caries. *Biomed. Chromatogr*. 19:214-222.

Walsh L. J., P. R. L'Estrange, G. J. Seymour. (1996) High magnification in situ viewing of wound healing in oral mucosa. *Australian Dental Journal* 41:75-79.

Weber GF, Bjerke MA, DeSimone DW. (2011). Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci*.15;124(Pt 8):1183-93

Winter George, John Scales. (1963) Effect of air drying and dressings on the surface of a wound. *Nature*. 197: 91-92.

Wong Joyce, Corrie Gallant-Behm, Colin Wiebe, Karen Mak, David A. Hart, Hannu Larjava, Lari Haikkinen. (2009) Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: Evidence from the red Duroc pig model and humans. *Wound Rep Reg*. 17: 717–729.

Xu L, Lal K, Pollock JJ. (1992). Histatins 2 and 4 are autoproteolytic degradation products of human parotid saliva. *Oral Microbiol Immunol.* 7 :127-8.

Yaguchi, T., & Kawakami, Y. (2012). Diagnostic marker for malignant melanoma, pharmaceutical composition containing substance suppressing function of histatin-1 protein, and immunosuppressive agent. PATENT WO/2012/023588 A1

Yang J, Yao W, Qian G, Wei Z, Wu G, Wang G. (2015). Rab5-mediated VE-cadherin internalization regulates the barrier function of the lung microvascular endothelium. *Cell Mol Life Sci.*72(24):4849-66.

9. ANEXOS.

1) Acta de aprobación de protocolo de investigación Comité Ético-Científico (CEC)

INFORME N°:2017/05

Acta de Aprobación de Proyecto “**La molécula salival histatina-1 promueve la migración celular**”, adscrito al Proyecto FONDECYT 1140907 “Elucidation of the Mechanisms Underlying Rab5 Mediated Focal Adhesion Disassembly, Cancer Cell Migration and Invasion”

1. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Fernández Godoy
Presidente CEC

Dr. Rodrigo Cabello
Miembro permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro permanente
CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro permanente CEC

Dra. Viviana Toro
Miembro alterno CEC

Dra. Paola Llanos
Miembro alterno CEC

Sra. Rebeca Galarce
Miembro permanente CEC

2. Fecha de Aprobación: 23/05/2017

Título completo del proyecto: “**La molécula salival histatina-1 promueve la migración celular**”, adscrito al Proyecto FONDECYT 1140907 “Elucidation of the Mechanisms Underlying Rab5 Mediated Focal Adhesion Disassembly, Cancer Cell Migration and Invasion”

3. Investigador responsable: Dr. Vicente Torres

4. Institución Patrocinante: Facultad de Odontología – Universidad de Chile

5. Documentación Revisada:

- Proyecto FONDECYT 1140907
- Currículo del investigador responsable
- Carta de Compromiso de IP
- Consentimiento Informado
- Declaración de conflictos de interés

6.- Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos metodológicos y éticos:

Enviar el proyecto (hipótesis, material y método, etc) correspondiente al nuevo estudio, además de la autorización de CONICYT si procede para agregar el nuevo estudio al proyecto FONDECYT. Especificar el criterio de inclusión, de manera que el estudio sea replicable.

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

- Agregar que el estudio se encuentra en el marco del proyecto FONDECYT 1140907 (y su título).
- En la sección “Justificación de la Investigación”, cambiar “moléculas” por “sustancias químicas” (simplificación del lenguaje). Además en “... entre ellas proteínas que influirían...” agregar “por ejemplo histatina-1”.
- Especificar los criterios de inclusión y exclusión, y hacerlos generales.
- En la sección “Confidencialidad y difusión de datos” agregar que los resultados podrán ser difundidos en reuniones científicas y a la comunidad.
- En la carta de consentimiento informado, modificar el punto 2 a “Sé que no tendré beneficios directos por participar en la Investigación”. Eliminar el punto 6 ya que no se realizará un registro, y eliminar la oración “PUESTO QUE SÉ QUE ES POR MI PROPIO

INTERÉS”

- Agregar el nombre del director del establecimiento donde se realiza la investigación (Nora Silva o Alexandra Angulo, o bien carta de ellas delegando el poder de autorizar). - Enviar alguna notificación, visto bueno o al menos un e-mail al coordinador de Grupo de Estudio de CONICYT manifieste que la elaboración del estudio está en regla.
- En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado “**La molécula salival histatina-1 promueve la migración celular**”, adscrito al Proyecto FONDECYT 1140907 “Elucidation of the Mechanisms Underlying Rab5 Mediated Focal Adhesion Disassembly, Cancer Cell Migration and Invasion”



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC

c/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.



2) Consentimiento informado

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación
Dirigido a personas de entre 18 y 40 años

Título del Proyecto: Influencia de la proteína salival histatina-1 en la migración y adhesión de células endoteliales.
(Influence of the salivary protein histatin-1 on endothelial cell migration and adhesion)

Investigador Principal: Vicente Armando Torres Gómez

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile
Calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago

Nombre del Participante:

.....
Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a
y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es **Vicente Torres Gómez** y soy académico del Instituto de Investigación Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo, Beneficios, Tipo de Intervención y procedimiento, Riesgos, Confidencialidad y Difusión de datos, Criterios para selección de los participantes en el estudio y Aclaraciones.

Justificación de la Investigación

Actualmente se sabe que las heridas en boca sanan más rápidamente y de mejor manera que en la piel. Se ha planteado que la saliva ayudaría en esta característica, debido a que presenta múltiples sustancias químicas, entre ellas proteínas que influirían sobre las estructuras orales, como por ejemplo histatina-1. Aún no se conoce la función de todas las sustancias químicas presentes en saliva, y, por lo tanto, identificar su relevancia en la protección de la cavidad oral, así como el mecanismo por el cual lo realizan, conllevará a un beneficio en el tratamiento de heridas, tanto en la boca, como en otras áreas del cuerpo.

Objetivo

En este estudio se propone demostrar si es que la proteína salival histatina-1 estimula la migración de células endoteliales (es decir, aquellas células responsables de la formación de nuevos vasos sanguíneos), lo cual constituiría un evento clave en la formación de nuevos vasos sanguíneos, explicando así el efecto reparador de la saliva. El estudio será realizado con saliva, la cual será posteriormente aplicada a células disponibles en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Este estudio se realiza en marco del proyecto FONDECYT 1140907 “Dilucidación de los Mecanismos Asociados al Desensamble de Adhesiones Focales, Migración e Invasión Celular Mediadados por Rab5” (título original inglés “Elucidation of Mechanisms Underlying Rab5 Mediated Focal Adhesion Disassembly, Cancer Cell Migration and Invasion”).

Beneficios

Usted no recibirá ningún beneficio directo por participar en este estudio, sin embargo los resultados serán de gran importancia en el área de la medicina.

Tipo de Intervención y Procedimiento
Si decide participar, se le solicitará donar una muestra de 2 ml de saliva. Para esto deberá haberse

lavado los dientes por lo menos 30 minutos antes de la toma de muestra.

Riesgos

No hay riesgos asociados ni durante, ni posterior al procedimiento.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Criterios de inclusión:

Personas entre los 18 y 40 años de edad.

Sin exposición a radioterapia de cabeza y cuello.

Que no haya sido diagnosticada con síndrome de Sjögren.

Que no consuma alguno de los siguientes fármacos:

a) Amitriptilina, Imipramina, Sertralina, Fluoxetina.

b) Furosemida, Hidroclorotiazida, Enalapril, Nifedipino, Losartan.

Criterios de exclusión:

Personas que no cumplan el rango etario propuesto.

Que hayan sido expuestas a radioterapia de cabeza y cuello

Con diagnóstico de síndrome de Sjögren.

Que consuma alguno de los siguientes fármacos:

a) Amitriptilina, Imipramina, Sertralina, Fluoxetina.

b) Furosemida, Hidroclorotiazida, Enalapril, Nifedipino, Losartan.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. Los resultados emanados de este estudio podrán ser difundidos en revistas y reuniones científicas, como también en la comunidad, siempre utilizando los datos de manera encriptada.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Sé que no tendré beneficios directos por participar en la investigación
3. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
5. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
6. En caso de cualquier duda puede acudir al Dr. Vicente Armando Torres Gómez, cuya oficina y laboratorio se encuentran ubicados en el 4to piso del Edificio Administrativo de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Su dirección es Calle Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago. El Dr. Vicente Torres se encontrará disponible de Lunes a Viernes de 8:00h a 17:00h en la dirección indicada, o vía telefónica al 22 978 1757, o bien dirigirse al Dr. Eduardo Fernández, Presidente del Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (E-mail: cec.fouch@odontologia.uchile.cl).

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente.

Nombre del participante: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Vicente Torres Gómez

Investigador principal

Firma: _____

Fecha: _____

Nora Silva Steffens

Directora de la escuela de pregrado de la facultad de odontología de la Universidad de Chile

Firma: _____

Fecha: _____

3) Certificación Histatina-1

Quality Control Report

Date:	2017-05-24
Order Number:	#SP150567
Catalog Number:	204795
Peptide Name:	VT peptide (DN-38P)
Sequence:	D{pSER}HEKRHHGYRRKFHEKHHSHREFPFYGD YGSNYLYDN
Lot Number:	P150609-WF204795
Molecular Formula:	C ₂₁₇ H ₂₉₈ N ₆₉ O ₆₄ P ₁
Molecular Weight:	4928.19
Mass Spectral Analysis:	Consistent - See attached
Purity (by HPLC):	98.89% (98% Requested) - see attached
Salt Form:	Acetate Salt
Quantity:	10.0mg
Appearance:	White to off White Powder
Reconstitution Condition Used in Purification:	1.0mg peptide soluble in 1.0ml H ₂ O
Acetate content:	1.020%
TFA content:	0.166%
Solubility Test:	1.0mg peptide soluble in 1.0ml H ₂ O. For Reconstitution Guideline, please visit: http://biomatik.com/linkfiles/PeptideHandlingGuideline.pdf

Storage, Reconstitution Condition and Handling

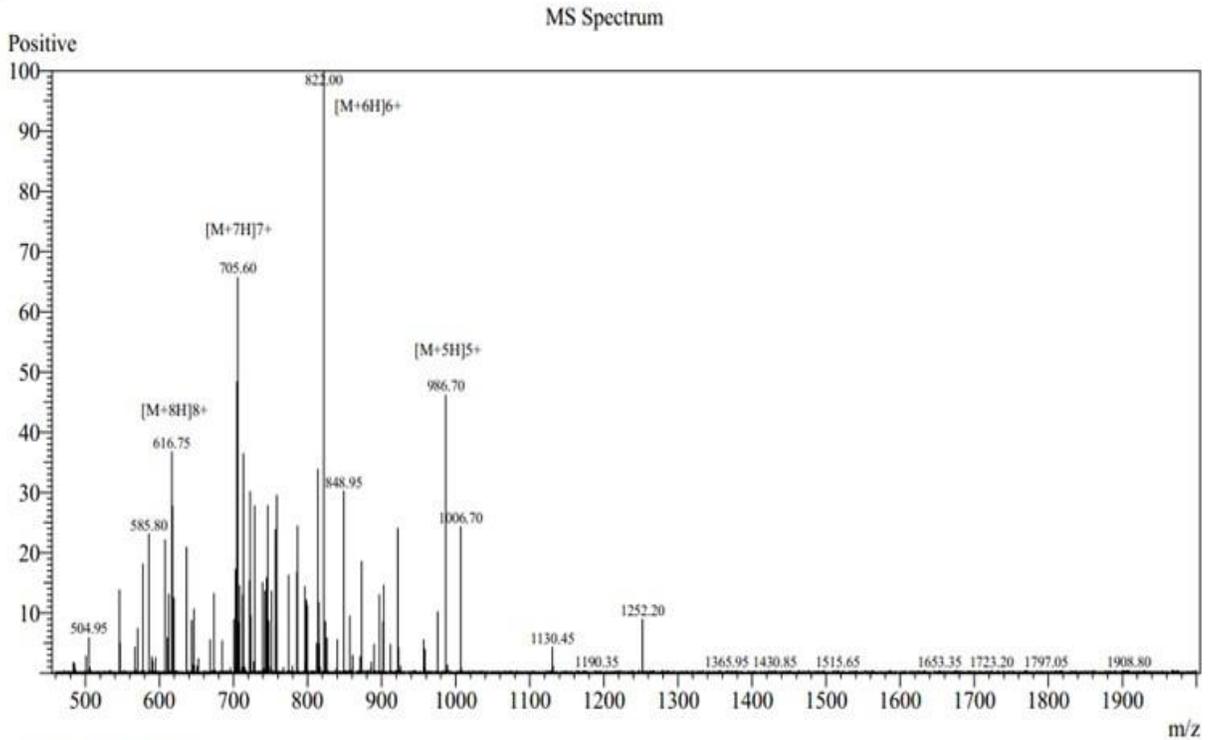
-20°C Upon Arrival. Please refer to the *Peptide Handling Guideline* for reconstitution condition and storage information. It is not recommended that peptides be stored in solution. The shelf life of peptides in solution is rather limited, especially for sequences containing Cysteine, Methionine, Tryptophan, Asparagine and Glutamine. Generally, the best approach is to reconstitute sufficient peptide for immediate usage only. For long-term storage please store at -20°C.

Limited Usage and Warranty

This product is for laboratory research use only. Not for diagnostic or in vivo use. Not for human or drug use.

Biomatik warrants material of said quality at the time of delivery. It is the sole responsibility of the customers to determine the adequacy of all materials for any intended or specific purpose or use. Biomatik' sole obligation shall be the replacement of the material without charge or refund of purchase price. This warranty does not apply to a product which has been tampered with or altered in any way or which has been misused or damaged by accident or negligence. All claims must be received in writing (by fax or email) within 30 days upon successful delivery and failure to do so shall constitute a waiver by customers for any and all such claims.

Mass Spectrometry Report



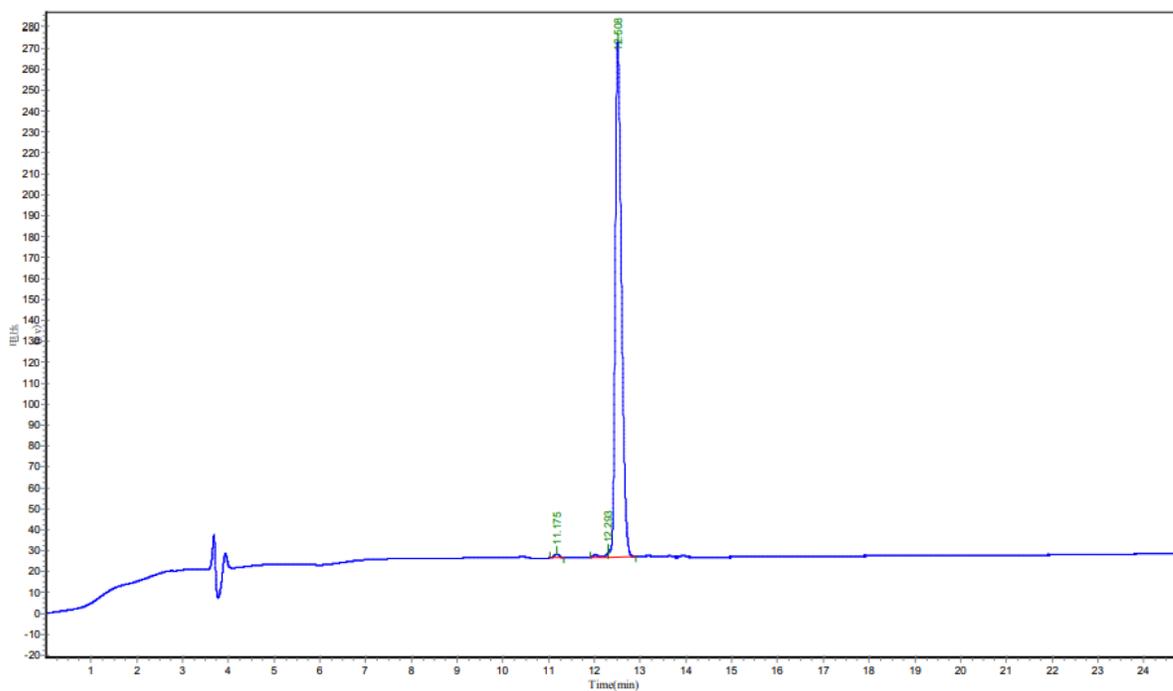
Sample Information

Acquired by : Qiu
Date Acquired : 2015-6-17 14:31:05
Injection Volume : 1
Sample Name : VT peptide DN-38P
MW : 4928.19
Lot No. : P150609-WF204795

Probe : ESI
Nebulizer Gas Flow : 1.5L/min
CDL : -20.0v
CDL Temp : 250 C
Block Temp : 200 C
Probe bias : +4.5kv
Detector : 2.0kv
T.Flow : 0.2ml/min
B.conc : 50%H2O/50%ACN

HPLC Report

Structure: VT peptide
DN-38P Lot NO :P150609-WF204795
Column :250*4.6mm,Kromasil-C18-5um
Solvent A:0.1%TFA in 100% water
Solvent B:0.1%TFA in 100%acetonitrile
Gradient : A B
0.1min 83% 17%
25.0min 35% 65%
25.1min 0% 100%
30.0min stop
Flow rate:1.0ml/min Wavelength
Volume :10ul



Peak No	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	11.175	1723.560	12245.908	0.5230
2	12.293	1962.323	13558.776	0.5791
3	12.508	246268.906	2315724.000	98.8979
