



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS COMPARATIVOS DE DOS DOMINIOS
DERIVADOS DE CALRETICULINA DE *TRYPANOSOMA
CRUZI* EN ENSAYOS DE CURACIÓN DE HERIDAS *IN
VITRO***

Natalia Andrea Parra Corvalán

Proyecto de Memoria para optar
al Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Ciencias
Clínicas

PROFESOR GUÍA: JOSÉ IGNACIO ARIAS FERNÁNDEZ
Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 11130257

SANTIAGO, CHILE
2016

RESUMEN

La calreticulina (CRT) es una proteína chaperona del retículo endoplásmico, que está ampliamente distribuida en las células eucariotas. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la CRT tiene un importante rol en la cicatrización de heridas cutáneas y diversos procesos asociados con la reparación cutánea, como la proliferación y migración celular. La CRT está constituida por tres dominios distintos, estructural y funcionalmente hablando, donde el dominio P y C contienen sitios de interacción con calcio y el dominio N contiene una secuencia de señal dirigida al retículo endoplásmico. Asimismo, se sabe que el dominio "N" es el responsable del efecto antiangiogénico y antitumoral descrito para esta proteína, y el subdominio "S" de la inhibición de la vía clásica del sistema del complemento humano. Sin embargo, no han sido determinados aún los dominios específicos de CRT implicados en el proceso de cicatrización de heridas. El objetivo principal de esta memoria de título fue analizar los dominios responsables de la proliferación y migración celular, lo cual se realizó comparando el efecto de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* recombinante (rTcCRT) con dos de sus dominios (N y S), en cicatrizaciones de heridas *in vitro*, con fibroblastos dérmicos de ratas. rTcCRT completa indujo un mayor porcentaje de migración celular en comparación a los dominios N y S. Por otro lado, los dominios N y N+S indujeron mayor aumento en el número de células viables. Estos resultados sugieren que el dominio N-terminal de rTcCRT es el que estimula proliferación celular y el dominio C, es el posible responsable de la inducción de migración celular generada por rTcCRT.

Palabras clave: Calreticulina, dominio, *in vitro*, migración, proliferación, viabilidad.

ABSTRACT

Calreticulin (CRT) is a chaperone protein of the endoplasmic reticulum, which is widely distributed in eukaryotic cells. Various studies *in vitro* and *in vivo* have shown that CRT plays an important role in wound healing and various processes associated with skin repair, such as wound cell proliferation and migration. CRT is comprised of three distinct structural and functionally speaking domains, where P and C domain contain calcium interaction sites and N domain contains a signal sequence to the endoplasmic reticulum. It is also known that the "N" domain is responsible for the anti-angiogenic and antitumor effect described for this protein, and "S" subdomain of the inhibition of classical pathway of human complement system. However, they have not yet been determined CRT specific domains involved in the wound healing process. The main aim of this research was to analyze the responsible domains for cell proliferation and migration, this was done comparing the effect of the recombinant *Trypanosoma cruzi* Calreticulin (rTcCRT) and their two domains, N and S, in scarring wounds *in vitro*, with rat dermal fibroblasts. Complete rTcCRT showed a higher percentage of cell migration compared to N and S domains. On the other hand, N and N+S domains induced greater increase in the number of viable cells. These results suggest that the N-terminal domain stimulates cell proliferation and C-domain, is possible responsible for the induction of cell migration by rTcCRT.

Key Words: Calreticulin, domain, *in vitro*, migration, proliferation, viability.

INTRODUCCIÓN

Es indiscutible la importancia de la piel como barrera inmunológica para los seres vivos, es por esto que es importante tener en cuenta que la cicatrización de heridas es más un proceso reparativo que regenerativo (Valencia, 2010). La piel está constituida por la epidermis y dermis, siendo complejo su proceso de reparación por la gran interacción entre células inflamatorias, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, junto con factores de crecimientos y enzimas. Al ser complejo este proceso, muchas veces está lejos de ser perfecto a nivel funcional y estético (Martin, 1997). Muchos estudios han intentado mejorar y optimizar el proceso de cicatrización, sobre todo en pacientes con heridas muy extensas, como en pacientes quemados, y en pacientes con patologías que les impide una correcta cicatrización, como es el caso de los pacientes diabéticos (Atiyeh *et al*, 2005).

Existen muchas aproximaciones terapéuticas dentro del área de reparación tisular, pero existen distintas desventajas en éstas que siguen incentivando el estudio de nuevos tratamientos (Atiyeh *et al*, 2005). En relación a los tratamientos y técnicas actuales más importantes, se resaltan el uso de membrana amniótica humana, injertos de piel autólogos, cultivo de queratinocitos, aplicación de citoquinas, ingeniería de tejidos, entre otros. Algunas de sus desventajas son los altos costos de producción, necesidad de grandes cantidades para generar efectos y difícil manipulación (Sánchez, 2011). Un tratamiento que destaca en esta área, es la aplicación de factores de crecimiento (FC), que en estudios *in vitro* demostraron tener un rol importante en la cicatrización de piel (Hong *et al*, 2013). Sin embargo, se determinó que al ser ocupados como agente terapéutico único, o en la aplicación de sólo un FC, presentan un impacto limitado en la cicatrización (Mustoe *et al*, 2006, Lynch, 1989). Los problemas de los FC parecieron ser solucionados con la nueva terapia con células madres mesenquimales (MSC). No obstante, distintos estudios sugieren que las MSC podrían ser tumorigénicas a través de distintos mecanismos (Matushansky I *et al*, 2007, Djouad F *et al*, 2003).

Una alternativa al uso de las anteriores terapias para mejorar la regeneración celular, es la proteína calreticulina (CRT). En este sentido, el rol de la CRT en el proceso de cicatrización de heridas está muy bien establecido. Esta proteína, que fue aislada por primera vez en 1974, y desde entonces ha sido extensivamente estudiada por muchos laboratorios (Michalak *et al*,

1999), ha demostrado tener un rol importante en la cicatrización tisular, estando involucrada en aspectos críticos dentro de ésta, como adhesión, apoptosis, fagocitosis, migración y proliferación celular (Gold *et al*, 2010; Gardai *et al*, 2005; Basu *et al*, 1999). Un importante estudio *in vivo* mostró que las heridas tratadas con CRT humana (HuCRT) muestran una mayor tasa de epitelización por migración de los queratinocitos y una fuerte inducción de tejido de granulación producido por un mayor número de fibroblastos en comparación a los controles en modelos animales porcinos y murinos (Gold *et al*, 2012). Además, en un estudio realizado el año 2008, se demostró que la aplicación tópica de HuCRT, en heridas en porcinos, mejora los dos procesos más importantes requeridos para una eficiente y apropiada cicatrización, la re-epitelización de la herida y la formación de tejido de granulación. Asimismo, las heridas tratadas con CRT tópica sanaron antes y exhibieron un epitelio más maduro, que las tratadas solo con solución buffer o con FC (PDGF-BB) (Nanney *et al*, 2008).

El interés por esta molécula aumentó con su descubrimiento en el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, denominándose TcCRT, que en estudios *in vitro* e *in vivo* demostró obtener mayores efectos que la molécula humana en sus propiedades anti-angiogénicas (Lopez *et al*, 2010). Conjuntamente, la TcCRT recombinante (rTcCRT) resulta, en términos equimolares, tres veces más eficiente que la HuCRT recombinante (rHuCRT) en aumentar la migración y proliferación de fibroblastos humanos *in vitro*. Un efecto similar se observa *in vivo* en heridas cutáneas de ratas (Arias *et al.*, 2015).

Esta proteína se compone, estructuralmente hablando, de tres dominios; N, P y C, y varios estudios han descrito que algunas funciones extracelulares se explican por la actividad de un dominio específico de la TcCRT. El dominio "N" es el responsable del efecto antiangiogénico y antitumoral, y el subdominio "S" de la inhibición de la vía clásica del sistema del complemento humano. Sin embargo, no han sido determinados aún los dominios específicos de TcCRT implicados en el proceso de cicatrización de heridas (López *et al.*, 2010).

Es por esta razón, que el comparar el efecto de TcCRT completa y dos dominios derivados en cicatrizaciones de heridas *in vitro*, permitirá recopilar información que determine los dominios específicos implicados en la regeneración cutánea y su eficacia por separado o en conjunto.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Piel

Es importante conocer la estructura y las funciones de la piel como base para la comprensión de su proceso de reparación. La piel es el órgano más extenso del cuerpo, representa el 15% del peso corporal y como órgano esencial, realiza funciones como proteger contra agresiones externas y microorganismos, mantener el contenido corporal de agua, controlar la temperatura, la regulación sensitiva, y absorber la luz ultravioleta. Todas ellas son funciones fundamentales para mantener una buena calidad de vida (Velásquez *et al.*, 2008).

La piel está compuesta por dos capas principales: epidermis y dermis. La epidermis es la capa más externa de la piel, es relativamente delgada y se compone mayormente de queratinocitos originadas desde el estrato basal (MacNeal, 2014). Se caracteriza porque las células más superficiales, llenas de queratina, mueren continuamente y se descaman. Al mismo tiempo, las células más profundas (células madre basales), proliferan y se diferencian continuamente manteniendo el equilibrio. La epidermis se compone de cinco estratos celulares, que en orden de profundidad son: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Velásquez *et al.*, 2008).

Bajo la epidermis se encuentra el mayor componente estructural de la piel, la dermis. Esta se encuentra formada principalmente por fibras de colágeno y elásticas, que confiere a la piel resistencia, elasticidad y flexibilidad. Además de tejido conjuntivo en esta capa se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, receptores y componentes celulares, otorgándole la capacidad de termorregulación, sensorial, y de almacenamiento de agua corporal (Foster *et al.*, 2013). La dermis consta además de dos capas: una profunda o reticular y otra superficial o papilar. La capa reticular está formada por haces de colágeno tipo I, que se disponen en conjuntos de fibras paralelas que se entrecruzan, y por fibras elásticas que soportan tensiones, evitan desgarros y dotan a la piel de distensibilidad. La capa papilar está compuesta por tejido conectivo laxo con tipos celulares como fibroblastos, macrófagos y mastocitos, que se encuentra constituida por las papilas dérmicas que son profusiones cónicas, a modo de relieves, que se interdigitan con la epidermis (Velásquez *et al.*, 2008).

Proceso de cicatrización de heridas

La cicatrización de una herida es un factor crítico en el bienestar de cualquier individuo, este proceso se constituye de una serie de reacciones metódicamente ordenadas de eventos biológicos, celulares y químicos que restauran la homeostasis alterada, y que a medida que el paciente va envejeciendo o enfermando se va haciendo menos eficiente (Sánchez, 2011). Normalmente la cascada de eventos que producen la cicatrización, se conduce por factores de crecimiento sintetizados principalmente por queratinocitos, fibroblastos y células inflamatorias. Estos factores de crecimiento regulan la proliferación y la diferenciación celular, cumpliendo un rol importante en la reparación tisular (Valencia, 2010). Este proceso entonces se compone de una serie de reacciones dinámicas que, aunque no pueden ser separadas, se distinguen cuatro fases que se superponen entre sí: coagulación, inflamación, migración-proliferación y remodelación (Sánchez, 2011).

En las primeras fases de coagulación e inflamación las plaquetas se agregan en el sitio de la herida, y se liberan diversos factores de crecimiento, lo que conduce a la vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos cercanos. Esto permite la migración de las células inflamatorias, que son atraídos por los factores de crecimiento, resultando en la estimulación de la cascada de coagulación, que forma el tapón de fibrina, que junto con la fibronectina proporcionan una matriz provisional para el reclutamiento de más células inflamatorias y de fibroblastos, además permite la angiogénesis. También como respuesta inmune son atraídos los neutrófilos y posteriormente los macrófagos, que previenen infecciones por organismos patógenos (Blakytyn y Jude, 2006).

En la etapa de migración y proliferación, los factores de crecimiento, que continúan atrayendo más células, estimulan la metamorfosis celular, iniciando la formación de tejido de granulación, y conjuntamente los fibroblastos comienzan a secretar material de matriz extracelular (MEC). Los proteoglicanos (PGs) constituyen un elemento estructural importante de la MEC, los cuales además de cumplir una función estructural, al absorber agua y llenar los espacios entre el colágeno y las fibras de elastina, tiene funciones regulatorias al influenciar la proliferación, migración y adhesión celular (Valencia, 2010). Las células epidérmicas y dérmicas migran a través de la herida, que junto con la

proliferación celular en el margen de la herida, conduce al cierre de los bordes de la epidermis (Blakytyn y Jude, 2006).

Finalmente, en la fase de remodelación del tejido de granulación, aumenta la síntesis de fibras de colágeno, de tal manera que la tasa sintética es mayor que su degradación, especialmente por las metaloproteinasas de matriz de colágeno que reemplazan a la MEC provisional y conduce a la formación de cicatrices. Con el tiempo la tasa de síntesis vuelve a los niveles normales, con el colágeno de la herida y otras proteínas de la matriz siendo degradadas (Blakytyn y Jude, 2006).

Fibroblastos

Los fibroblastos dérmicos son un componente esencial de la piel, son células de origen mesenquimático, encargados de la síntesis y degradación del tejido fibroso y no fibroso de la MEC de la dermis, que forman el tejido conectivo (Foster et al., 2013). Además, tienen la capacidad de comunicarse entre ellos, llevando a cabo un papel crucial en la regulación de la fisiología de la piel. Son los encargados de liberar factores de crecimiento y citoquinas en los procesos de reparación para modular la actividad de los queratinocitos, evento crítico en el proceso de reparación de heridas (Velásquez *et al.*, 2008). Asimismo, los fibroblastos secretan colágeno, que representa casi un 80% de la MEC de la dermis, que proporciona fuerza y elasticidad a la piel, además de estar involucrado en la migración, adhesión y quimiotaxis celular (Foster et al., 2013).

Calreticulina

La Calreticulina (CRT) es una proteína del retículo endoplásmico, que se encuentra involucrada en muchas funciones celulares. Actualmente, se sabe que además de localizarse al interior de las células, está en la superficie celular y a nivel extracelular, regulando así una variedad de procesos biológicos importantes, como asegurar el correcto plegamiento de proteínas, y también actuar en la regulación del metabolismo del calcio (Gold *et al.*, 2010; Michalak *et al.*, 1989). La CRT es una proteína chaperona de 46 kDa, constituida de tres dominios distintos desde el punto de vista estructural y funcional, donde el dominio P y C contienen sitios de interacción para calcio. El dominio N contiene una secuencia de señal dirigida al retículo endoplásmico (RE) (Nanney *et al.*, 2008, Michalak *et al.*, 1989). Además,

en un estudio realizado en el 2004, se comprobó que la inhibición de la vía clásica del sistema del complemento humano se encuentra en el subdominio "S" (Ferreira *et al.*, 2004).

La CRT está ampliamente distribuida en las células eucariotas, expresándose en células de diferentes mamíferos. Esta proteína, que fue aislada por primera vez en 1974, y desde entonces ha sido extensivamente estudiada por muchos laboratorios (Michalak *et al.*, 1999), ha demostrado en diversos estudios tener un rol importante en la cicatrización tisular, estando involucrada en aspectos críticos dentro de ésta, como adhesión, apoptosis, fagocitosis, migración y proliferación celular (Gold *et al.*, 2010; Gardai *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 1999). Además de también ser muy estudiada por sus efectos antitumorales y antiangiogénicos (Lopez *et al.*, 2010), la CRT es considerada una proteína de respuesta al estrés, ya que ha demostrado aumentar su concentración en sitios de heridas e hipoxia (Nanney *et al.*, 2008).

Existen estudios que demuestran que CRT induce la migración de queratinocitos fibroblastos, macrófagos y monocitos en una forma concentración-dependiente, estimulando de esta forma la cicatrización y reepitelización de heridas por medio del aumento de más del doble de la proliferación celular de cultivos primarios humanos de queratinocitos, fibroblastos, y células endoteliales microvasculares (Nanney *et al.*, 2008).

El uso de CRT aplicada tópicamente, ha demostrado aumentar la tasa de cicatrización de las heridas cutáneas, mostrando una mayor tasa de epitelización, por migración de los queratinocitos, y mayor tasa de proliferación de fibroblastos, produciendo mayor tejido de granulación en comparación a los controles en modelos animales porcinos y murinos (Gold *et al.*, 2010).

Además, en un estudio *in vitro* realizado en heridas porcinas tratadas tópicamente con CRT, se demostró que CRT tiene la capacidad de estimular la migración de monocitos y líneas celulares de macrófagos, explicando el alza de macrófagos tisulares en comparación con los controles del estudio (Arias *et al.*, 2012). Conjuntamente, HuCRT se une al receptor CD91/LRP1/CRT de macrófagos para inducir la secreción de citoquinas, confirmando un rol de esta proteína en el sistema inmune, importante también para los procesos de cicatrización de heridas (Gold *et al.*, 2012).

En un estudio realizado el año 2008, se demostró que la aplicación tópica de HuCRT en heridas en porcinos, mejora los dos procesos más importantes requeridos para una eficiente y apropiada cicatrización, la re-epitelización de la herida y la formación de tejido de granulación. Además, las heridas tratadas con CRT tópica sanaron antes y exhibieron un epitelio más maduro, que las tratadas sólo con solución buffer o con FC (PDGF-BB) (Nanney *et al.*, 2008).

Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*

El protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Tc), es el parásito responsable de la enfermedad de Chagas. A diferencia de otros tripanosomas de transmisión sanguínea como *Leishmania sp.* y *Trypanosoma brucei*, el *T. cruzi* cicla entre fases extracelulares e intracelulares, lo que se relaciona con una menor susceptibilidad a drogas y a la respuesta inmune humoral del hospedero. La TcCRT es una de las moléculas involucradas en varios aspectos de esta interacción hospedero-parásito (Arias *et al.*, 2015).

La TcCRT es una proteína de 45 kDa y es 50% homologa a HuCRT (Molina *et al.*, 2005). Esta proteína se localiza en el RE, en la superficie de la membrana celular y fuera del parásito (Arias *et al.*, 2012). Debido a su capacidad para unirse a laminina y de inhibir proliferación de células endoteliales, el dominio N de TcCRT demostró tener propiedades antiangiogénicas (Ramírez-Tolosa *et al.*, 2016) y el subdominio "S" de inhibir la vía clásica del sistema del complemento humano (López *et al.*, 2010; Pike *et al.*, 1998).

Por otro lado, el papel de la angiogénesis en la progresión de tumores sólidos ha sido de larga data en una variedad de modelos experimentales. Por esta razón, un estudio puso a prueba la capacidad de TcCRT y HuCRT para inhibir *in vivo* el crecimiento de un tumor mamario en ratón. El estudio mostró que sólo TcCRT tiene efectos anti-tumorales importantes (López *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista funcional, TcCRT presenta efectos antiangiogénicos y antitumorales más fuertes que HuCRT, como se determinó en pruebas *ex vivo* e *in vivo* (Pike *et al.*, 1998). De la misma forma, se ha podido determinar que TcCRT es tres veces más eficiente, en términos equimolares, que HuCRT en su habilidad de modular el comportamiento de los fibroblastos en el ensayo *in vitro* (*Scratch plate*), al aumentar la migración y proliferación de

fibroblastos humanos *in vitro* (Arias *et al.*, 2015). Asimismo, en términos equimolares, TcCRT es tres órdenes de magnitud más eficiente que HuCRT en su capacidad de modular la regeneración de defectos óseos *in vivo* (Arias *et al.*, 2012).

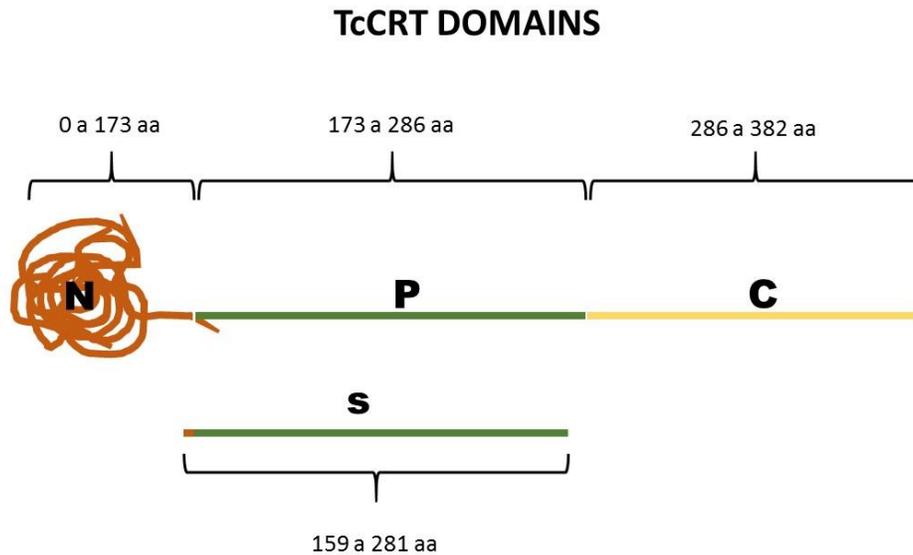


Figura 1. Esquema estructural de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*. *aa: amino ácido.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, esta memoria de título analizó y comparó el efecto de la proteína TcCRT completa y dos sus dominios en ensayos de “heridas” *in vitro*, permitiendo identificar el dominio específico de TcCRT que tiene la función de cicatrización cutánea. Esto permitiría acercarse a la creación de potenciales medicamentos que sean más eficientes que la actual CRT tópica, utilizando sólo el dominio específico que modula la acción reparadora en piel.

HIPÓTESIS

El efecto estimulador de la proliferación y migración de fibroblastos *in vitro*, está determinado por distintos dominios de la Calreticulina de *T. cruzi*.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto de la proteína TcCRT completa y de los dominios N y S derivados de la TcCRT en ensayos de cicatrización de heridas y proliferación *in vitro* de fibroblastos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración de TcCRT que genera mayor porcentaje de migración y proliferación celular por separado, en un cultivo primario de fibroblastos de rata.
2. Determinar y comparar el porcentaje de migración celular en un cultivo primario de fibroblastos en respuesta a la misma concentración de los dominios N, S, N+S, y a la proteína TcCRT completa.
3. Determinar y comparar el porcentaje de proliferación celular en un cultivo primario de fibroblastos en respuesta a la misma concentración de los dominios N, S, N+S, y a la proteína TcCRT completa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa (BiMre), del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile y como parte del Proyecto FONDECYT 11130257 del Dr. Ignacio Arias.

1. Obtención de Calreticulina y sus dominios

Se utilizaron moléculas recombinantes (r) de TcCRT y sus dominios sintetizados en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM) dirigido por el Dr. Arturo Ferreira (Instituto de Cs. Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), y facilitados para el desarrollo de esta memoria de título.

2. Protocolo de aislamiento de fibroblastos

Todos los procedimientos con animales estuvieron de acuerdo con lo establecido por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) y la *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* y fueron supervisados por personal médico veterinario. El protocolo experimental para el uso de los animales que aquí se propone fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (certificado en Anexo 1).

En la investigación se utilizaron fibroblastos dérmicos de piel de dos ratas Sprague-Dawley, que fueron sacrificadas con una sobredosis de anestésico inhalatorio (Isoflurano). La zona de la piel abdominal, que fue extraída, se desinfectó bajo protocolo de cirugía, luego depilada, cortada con tijeras cirujanas, y colocada en un tubo Falcón de 50 ml con solución salina tamponada de Hank (HBSS) para su traslado a la campana de flujo laminar del laboratorio.

El tejido extraído se colocó en una placa Petri con HBSS para limpiar la sangre y pelos con el borde romo de un bisturí. El tejido se trasladó a otra placa Petri con HBSS limpio, donde se disgregó primero mecánicamente con una tijera cirujana estéril, tratando de cortar el tejido lo más pequeño posible y luego químicamente colocando el tejido disgregado en un tubo tipo Falcón de 50 ml con 20 ml de colagenasa al 0,25% por 90 minutos a 37° C. Luego se retiró el tejido del tubo tipo Falcón y se agregó medio de cultivo completo (MEM), compuesto de

Medio Esencial Mínimo modificado Alfa (α MEM) (Hyclone®); 10% Suero Fetal Bovino (SBF) (Hyclone®); 1% Antibiótico-antimicótico (Hyclone®) para detener el efecto de la colagenasa. La solución resultante fue centrifugada a 2000 rpm a 25° C por cinco minutos en una centrífuga termoregulada (Heraeus®). Terminado el proceso de centrifugado se obtuvo un pellet de fibroblastos, primero se retiró el sobrenadante y luego el pellet fue re-suspendido en α MEM para finalmente sembrarlo en una botella de cultivo con 7 ml de α MEM 10% SBF totales.

3. Protocolo de cultivo de fibroblastos

Las botellas sembradas con los fibroblastos obtenidos del aislamiento fueron incubadas en una incubadora VWR® a 37° C y 5% CO₂. Al alcanzar aproximadamente el 70% de confluencia, las células fueron lavadas con HBSS, y se procedió a remover las células adheridas al frasco con tripsina al 0.25% - 2.21 mmol/L EDTA (Hyclone®). El medio con las células flotantes fue centrifugado, obtenido el pellet las células fueron teñidas con Azul Tripán, para ver viabilidad celular, las células fueron contadas con un hemocitómetro bajo un microscopio invertido, y finalmente congeladas en crio-tubos con medio completo más 20% SFB y DMSO, para evitar daño celular al congelamiento, a -80° C hasta el momento que fueron utilizadas para los ensayos.

4. Ensayo de raspado de placa (*Scratch Plate*)

El ensayo de raspado de placa es considerado como una buena prueba *in vitro* para medir la migración celular, ya que se correlaciona con parámetros importantes del proceso *in vivo* (Nanney *et al.*, 2008). Se realizaron dos ensayos distintos de raspado de placa, el primero utilizando diferentes concentraciones de rTcCRT, y el segundo utilizando rTcCRT y sus dominios N, S y N+S.

Para el primer ensayo se sembraron 3 placas de 24 pocillos de cultivo a 5.5×10^4 células por pocillo, en α MEM 10% SBF, a las 24 horas de incubación alcanzaron confluencia de aproximadamente 70 a 80% y en cada pocillo se realizó un raspado trazando una línea por el centro del pocillo con una punta plástica de micropipeta de 200 μ l y luego se lavaron los pocillos con HBSS para remover las células desplazadas, en este momento se toman las imágenes en tiempo 0 de la línea de raspado de cada pocillo, utilizando un microscopio

invertido (Motic® Pro 282A) y el programa *Motic Images Plus* v.2.0. A continuación, se agregaron a los cultivos de fibroblastos raspados, las siguientes concentraciones de rTcCRT; 10, 20, 40, 80 y 160 ng/ul, realizándose 9 repeticiones de cada tratamiento.

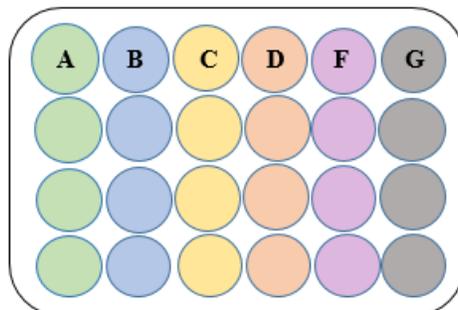


Figura 2. Esquema utilizado en las placas de 24 pocillos para el ensayo de raspado de distintas concentraciones de rTcCRT. A: 10 ng/ul; B: 20 ng/ul; C: 40 ng/ul; D: 80 ng/ul; F: 160 ng/ul; G: Control negativo (Sólo MEM).

Después de 24 horas de incubación, las células fueron teñidas con azul de Coomassie al 0.025% en 10% ácido acético: 45% metanol por 10 minutos y lavados dos veces con HBSS.

Una vez terminada la fijación y tinción de los fibroblastos, la placa fue nuevamente observada bajo microscopio invertido, y se obtuvo una segunda imagen de cada área de raspado (tiempo 1). El cierre del área de raspado (migración celular) fue determinado utilizando el programa *National Institutes of Health Image J* v.1.37 al colorear las células migradas al área de raspado (comparando imagen tiempo 0 y tiempo 1 de cada pocillo, imagen ejemplo en Anexo 2), para así calcular el porcentaje de cierre con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Número de pixeles coloreados (células migratorias)}}{\text{Número de pixeles en el área de raspado al tiempo 0}} \times 100$$

El porcentaje de cierre fue analizado y comparado entre las distintas concentraciones de rTcCRT.

Para el segundo ensayo de raspado se utilizó la concentración que comparativamente en el primer ensayo demostró mayor porcentaje de migración, se usó rTcCRT, y sus dominios N,

S y N+S, todas a la misma concentración por pocillo de 20 ng/ul. Se realizó el mismo protocolo anterior, realizándose 18 repeticiones de cada tratamiento.

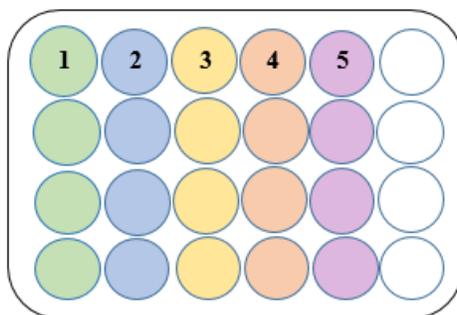


Figura 3. Esquema utilizado en las placas de 24 pocillos para el ensayo de raspado de rTcCRT, dominio N, S y N+S a 20ng/ul por pocillo. 1: Dominio N; 2: Dominio S; 3: Dominios N y S; 4: rTcCRT; 5: Control negativo (Sólo MEM).

4. Ensayo de proliferación celular (MTT)

Para medir el número de células viables se utilizó el método *Thiazolil Blue Tetrazolium Bromide* (MTT) (Invitrogen ®), el cual es un método colorimétrico que se basa en la medición del metabolismo celular basado en la reducción de la MTT, por acción de las succinato-deshidrogenasas mitocondriales, lo que produce el cambio del color amarillo de la MTT a color azul violeta. Esta reducción ocurre sólo cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas, por lo tanto, el cambio del color se relaciona directamente con el número de células viables.

Se realizaron dos ensayos de MTT, el primero para encontrar la concentración de rTcCRT con la cual se obtuvo un mayor aumento del número de células viables, y el segundo ensayo para comparar los dominios N, S y N+S, y rTcCRT por separados.

Para el primer ensayo se sembraron fibroblastos en placas de 24 pocillos a 2×10^4 células por pocillo con 1 ml de MEM (10% SFB y 1% Ab) y se dejó incubando 24 horas, para que las células se adhirieran al pocillo y determinar el *input*, que es el número de células adheridas al pocillo al momento de empezar el tratamiento, a este instante del experimento se le consideró tiempo 0. Determinado el *input* se añadió a los pocillos rTcCRT completa en concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 160 ng/ μ l, realizándose 4 repeticiones de cada tratamiento (Esquema Figura 2). Los fibroblastos fueron incubados por 24 horas con rTcCRT a 37° C en 5% CO₂.

Terminada las 24 horas de tratamiento se desechó el medio y se agregó 1 ml de MEM más 100 µl de MTT al 0.5% y se dejó incubando, bajo las mismas condiciones, por otras tres horas. A continuación se desechó el MTT reactivo, se lavaron dos veces los pocillos con HBSS y luego se añadió 1 ml de solución de lisis (10% SDS en DMSO/HCl), y se dejó sonicando por cinco minutos. Para finalizar, en una placa de 96 micro-pocillos se colocó 200 µl/pocillo de la solución de lisis resultante, y en un lector de ELISA se leyó la absorbancia a 550 nm. Para poder determinar el número de células viables totales por pocillo se comparó la absorbancia resultante con una curva de proliferación celular estandarizada previamente construida (Protocolo en Anexo 3).

En el segundo ensayo de MTT se utilizó el mismo protocolo que el ensayo anterior, utilizando rTcCRT, sub-fragmento S, dominio N, y N más S, en pocillos por separado, en concentración de 20 ng/pocillo de cada uno, realizándose 6 repeticiones de cada tratamiento (Esquema Figura 3). Los datos recolectados para ambos ensayos de MTT, son expresados sin el *input*, es decir, a los resultados del número de células por pocillo se restó el *input* (Número de células adheridas al pocillo en el tiempo 0).

Análisis de los resultados

Los datos obtenidos en los ensayos de raspado de placa y MTT fueron recolectados con el programa Excel. Se utilizó el programa Infostat® para realizar los análisis estadísticos. Los resultados fueron agrupados bajo el criterio de número de células y “porcentaje de cierre de herida”. Luego para saber qué tipo de distribución tenían los datos se realizó la prueba de Shapiro Wilks (modificado), resultando en que los datos tenían distribución normal, por lo que se aplicó análisis de varianza y prueba de comparación LSD Fisher, con una sensibilidad de 0,1%.

RESULTADOS

Los ensayos de este estudio fueron todos realizados bajo las mismas condiciones, se utilizaron fibroblastos dérmicos de rata, utilizando en cada ensayo los mismos pasajes de células. En el ensayo de MTT se utilizó fibroblastos de pasaje 18, mientras que en el “*scratch plate*” se utilizaron fibroblastos de pasaje 20.

Los resultados en este estudio fueron divididos en dos partes, primero el ensayo de raspado de placa, para medir migración celular, y en segundo lugar el MTT, para medir proliferación celular, donde los resultados son entregados sin el *input*, es decir, se restó el número de células que había al momento de añadir rTcCRT a los pocillos; así se obtuvo el número exacto de células en que aumentó con el tratamiento de rTcCRT y sus dominios. En ambos ensayos se realizó primero un ensayo de titulación para encontrar la concentración óptima de rTcCRT.

Ensayo de raspado de placa

En el primer ensayo de raspado de placa se analizaron 54 pocillos en total, donde se realizaron 9 repeticiones de cada concentración de rTcCRT: 10, 20, 40, 80 y 160 ng/ul, la que fue aplicada al observar la confluencia deseada y dejada incubar por 24 horas.

En la Tabla 1 se observan los porcentajes promedios del cierre de área de raspado para cada uno de los tratamientos. En donde se observa que el máximo efecto sobre la migración celular fue obtenido con 10 ng/μl. Control negativo muestra los porcentajes más bajos de migración celular.

Tabla 1. Porcentaje (%) promedio de cierre del área de raspado, en presencia de distintas concentraciones de rTcCRT.

Tratamiento (ng)	% promedio	D.E.
10	51	5,55
20	46	6,23
40	48	12,08
80	30	12,97
160	37	10,13
C-	27	7,27

La Figura 4 muestra que los resultados de migración celular con el tratamiento de 10, 20 y 40 ng/μl de rTcCRT no son significativamente diferentes, por lo tanto, en las tres concentraciones se obtuvo un aumento en la migración celular en comparación con los otros tratamientos.

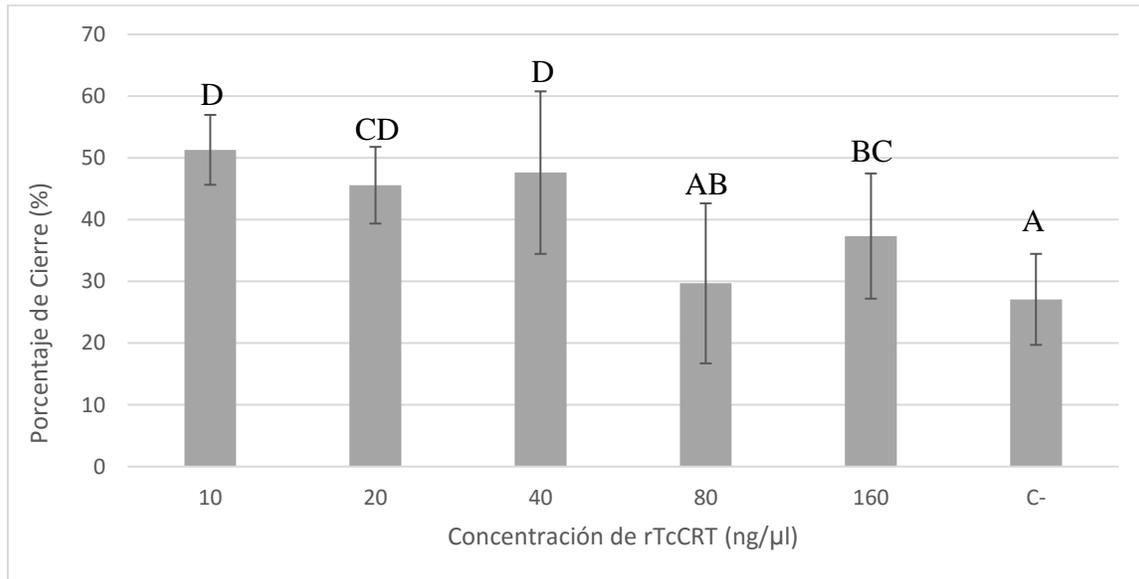


Figura 4. Porcentajes de cierre del área del ensayo de raspado en fibroblastos de ratas con tratamientos de 10, 20, 40, 80 y 160 ng/μl rTcCRT por pocillo. Tratamiento con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para el segundo ensayo de raspado, se decidió utilizar 20 ng/μl por pocillo, para así utilizar la concentración promedio entre las 3 concentraciones que generaron mayor migración celular y además para poder ser comparable con los resultados del ensayo de MTT, que también mostró los mayores efectos a esta concentración.

En el ensayo de raspado de comparación entre los dominios N, S y rTcCRT a 20 ng/μl por pocillo, se realizaron 18 repeticiones de cada tratamiento. En la Tabla 2 se muestran los resultados observados, donde los mayores efectos migratorios fueron inducidos por el dominio N, resultado que también fue observado por el dominio N+S. En el control negativo se obtuvieron resultados más de 3 veces menor a N.

Tabla 2. Porcentaje (%) promedio de cierre del área de raspado, en presencia de dominio N y S de rTcCRT y de la proteína completa.

Tratamiento	% promedio	D.E.
CRT	43	3,96
N	54	5,17
S	35	4,76
N+S	53	3,52
C-	16	4,06

Los resultados obtenidos muestran que el dominio N y los dominios N+S tienen mayor efecto migratorio, ya que indujeron un mayor porcentaje de cierre del área de raspado. No encontrándose diferencia significativa entre ambos, explicándose los efectos posiblemente sólo por el dominio N (Figura 5).

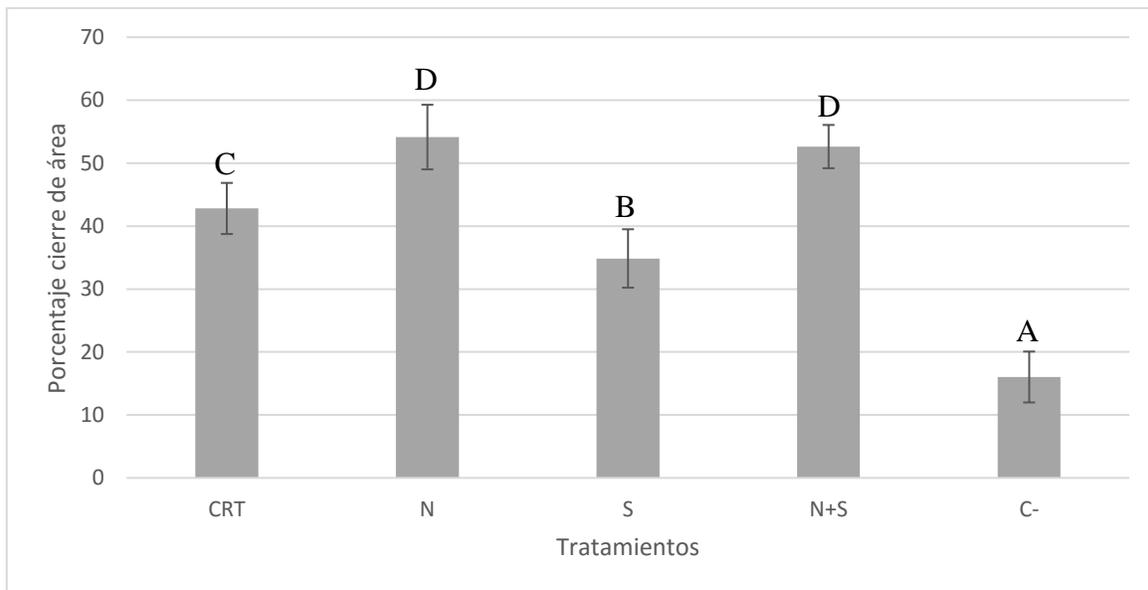


Figura 5. Porcentajes de cierre del área del ensayo de raspado en fibroblastos de ratas con tratamientos de rTcCRT completa y sus dominios N, S, N+S y a 20 ng/μl por pocillo. Tratamiento con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Ensayo MTT

En el primer ensayo de MTT se analizaron fibroblastos en presencia de distintas concentraciones de rTcCRT. En la Tabla 3 se observan los resultados para cada variable,

donde 20 ng/ μ l de rTcCRT desencadena un incremento máximo del número de fibroblastos estudiados.

Tabla 3. Número de células después de 24 hrs de tratamiento con rTcCRT a concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 160 ng/ μ l.

Tratamiento	Absorbancia promedio	Número de células
10	0,061	27.456
20	0,088	42.410
40	0,046	19.071
80	0,060	26.897
160	0,049	20.888
Control -	0,038	14.739

La Figura 6 muestra que a 20 ng/ μ l de rTcCRT genera mayor aumento en el número de células viables y, además se encuentra diferencia significativa con los demás tratamientos estudiados.

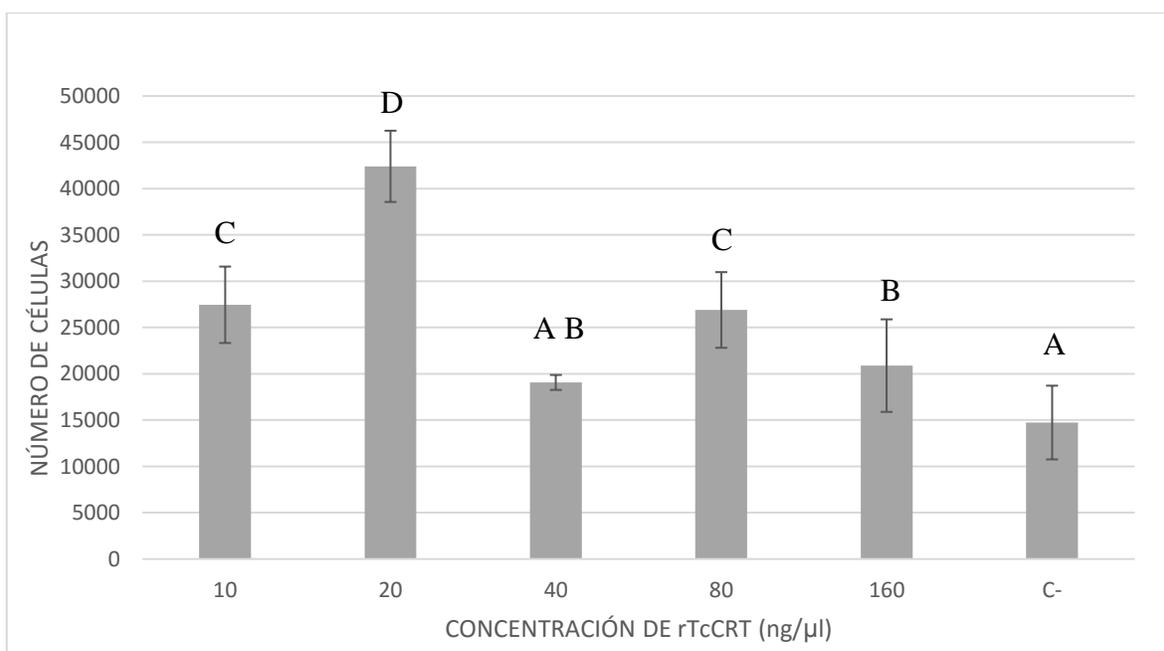


Figura 6. Número de fibroblastos en presencia de rTcCRT completa a 20 ng/ μ l por pocillo. Tratamiento con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Para el segundo ensayo de MTT, se utilizó la concentración que comparativamente en el primer ensayo demostró mayor porcentaje de proliferación, utilizando 20 ng/ μ l de rTcCRT, y sus dominios N, S y N+S. Se analizaron los resultados de 30 pocillos, en donde se realizaron 6 repeticiones de cada tratamiento.

Los resultados expuestos en la Tabla 4 muestran que rTcCRT genera un mayor aumento en el número de células viables en comparación a los otros tratamientos y al control negativo. A diferencia de los otros ensayos, el control negativo no indujo los resultados más bajos, siendo el dominio N el que generó un menor número de células en el tiempo analizado.

Tabla 4. Número de fibroblastos después de 24 hrs. de tratamiento con rTcCRT completa y sus dominios N, S y N+S a concentración de 20 ng/ μ l por pocillo.

Tratamiento	Promedio absorbancia	Número de células 24hrs
TcCRT	0,22150	94.164
N	0,10183	27.270
S	0,11217	33.046
N+S	0,10717	30.251
Control -	0,10667	29.972

Con estos resultados obtenidos en el ensayo de MTT, se pudo determinar que N y S no tienen un efecto sobre la proliferación de fibroblastos de rata, ya que no generaron diferencia significativa en el número de células luego de 24 horas de tratamiento en relación con el número de células del control negativo. Por otro lado, se observó un claro efecto pro-proliferativo gracias a la adición de la rTcCRT completa (Figura 7).

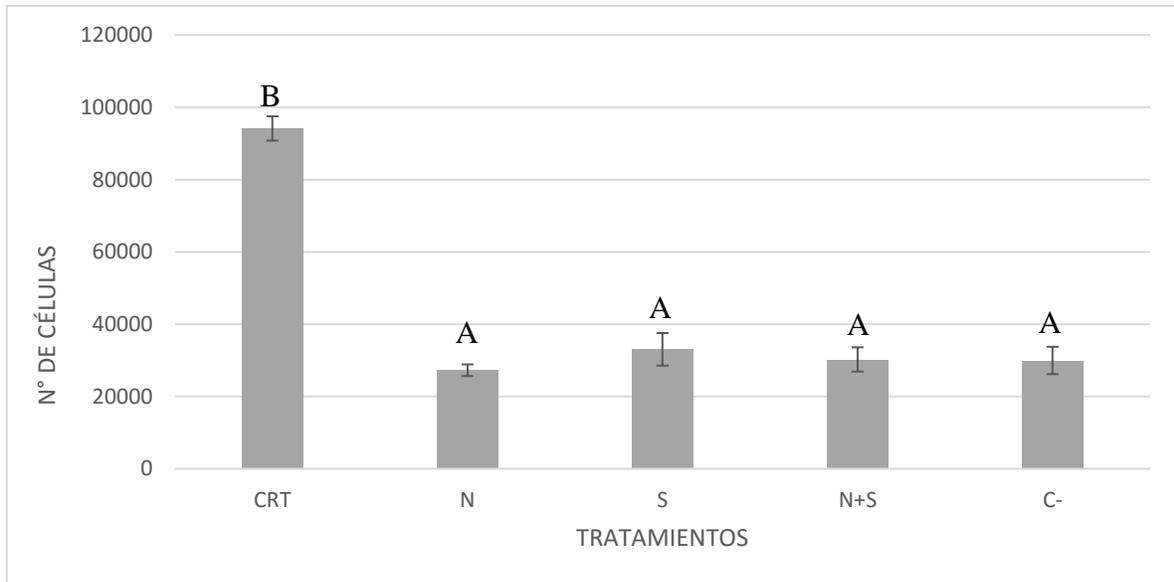


Figura 7. Número de fibroblastos en presencia de rTcCRT completa y sus dominios N, S, N+S y a 20 ng/ μ l por pocillo. Tratamiento con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Por la evidencia científica mostrada anteriormente, se justifica el interés en el estudio de los dominios de TcCRT, ya que aún estando bien estudiado el rol de CRT en la cicatrización de piel y también estando definidas algunas funciones de los dominios de CRT (Michalak *et al.*, 1999), aún no han sido determinados los dominios involucrados en la migración y proliferación celular. Este estudio comprende el primer acercamiento a definir el o los dominios que son los responsables de la función de cicatrización cutánea de la proteína Calreticulina de *Trypanosoma cruzi in vitro*, que comprende un arista fundamental al momento de la optimización de los usos de la Calreticulina y sus funciones extracelulares.

Esta tesis confirma los estudios realizados y mencionados anteriormente, que afirman que TcCRT tiene claros efectos pro-migratorios y proliferativos en fibroblastos *in vitro* (Gold *et al.*, 2010; Nanney *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, se pudo confirmar que los efectos estimulantes de TcCRT sobre ambos procesos no son directamente proporcionales a la concentración de éste, observándose un mayor efecto a baja concentración, tal como se observó en un estudio previo publicado en el año 2015 (Arias *et al.*, 2015).

En la búsqueda de la concentración óptima de rTcCRT se tomó el mismo estudio previo, donde se había observado que a 10 ng/μl de rTcCRT se obtenían los máximos efectos en los ensayos de migración y proliferación celular (Arias *et al.*, 2015), por esto es que en este estudio de tesis se utilizaron concentraciones de 10 a 160 ng/μl, concentraciones más bajas que las utilizadas en el estudio anterior para poder encontrar una concentración más cercana a la óptima. En el ensayo de migración se observaron 3 concentraciones 10, 20 y 40 ng/μl que inducen los mayores resultados migratorios (51%, 46% y 48%, respectivamente) y en el ensayo de proliferación celular, 20 ng/μl de rTcCRT gatilló los máximos efectos inductores (llegando a 42.410 células a 24 hrs. de incubación). Por lo tanto, en ambos ensayos se definió como concentración óptima 20 ng/μl de rTcCRT. La diferencia de los resultados obtenidos con los del estudio anterior pueden ser resultado de dos diferencias, los fibroblastos utilizados son de diferente origen, ya que en este estudio se utilizó fibroblastos de rata y en el estudio de Arias *et al.* 2015 se utilizaron fibroblastos humanos, y en las concentraciones de TcCRT ocupadas. En el estudio anterior utiliza como mínimo los 10 ng/ul y la siguiente

concentración usada es 100 ng/ul, dejando una gran ventana explorable, la que fue abordada por esta tesis.

Los resultados sugieren que en el dominio N de TcCRT radicaría la función inductora de migración celular, pues genera mayor migración que rTcCRT completa. El subdominio S muestra un efecto pro-migratorio, ya que indujo un mayor porcentaje de cierre de la herida que el control negativo, pero siendo su efecto menor a la de la proteína completa. Por otra parte, los resultados de N y N+S (con un 53%), no tienen diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que el dominio N sería el responsable de la migración celular inducida por la proteína completa, sin embargo, son necesarias nuevas aproximaciones experimentales para corroborar estos resultados, como por ejemplo estudiar TcCRT sin este dominio.

Por otro lado, ninguno de los dominios estudiados demostró tener la función inductora de proliferación sobre los fibroblastos estudiados dado que rTcCRT completa indujo mayor aumento en el número de células viables que los dominios analizados. A su vez, no hubo diferencias entre los diferentes dominios y el control negativo. Estos resultados podrían explicarse por el dominio C, ya que fue el único dominio que no pudo ser estudiado por separado de la proteína completa, lo que sugiere que el dominio C sería el responsable del efecto inductor de proliferación celular. Sin embargo, sería importante que se realizara otro estudio en donde se utilizara el dominio C para validar los resultados de este estudio. También cabe destacar que en este estudio, debido a que el subdominio S se constituye casi completamente del dominio P (Ferreira *et al.*, 2004) faltando sólo 5 aminoácidos para constituir por completo al dominio P, se le atribuyen las funciones del dominio P al subdominio S. De este modo, se descarta que el dominio P y N tengan la función proliferativa de la TcCRT, quedando sólo el dominio C como posible responsable de la capacidad proliferativa celular.

La proliferación y migración celular no son los únicos procesos biológicos que ocurren dentro de la cicatrización de heridas cutáneas, sin embargo, ambos son extremadamente importantes, y el aumento de ambos significaría una cicatrización más pronta, ya que se acelera el cierre de la herida por el aumento de producción de colágeno I, secretado por fibroblastos (Sánchez, 2011). Este estudio apuntaba a descubrir donde se encontraban

específicamente ambas funciones dentro de la TcCRT, para esto se decidió estudiar ambas por separado, ya que es más apropiado realizar investigaciones que estudien el efecto de una variable experimental.

Entra en discusión la función antiangiogénica de CRT versus su efecto potenciador de la cicatrización de heridas, ya que para que pueda ocurrir cicatrización en piel es necesario la neo-vascularización del tejido que se va formando. Sin embargo, la función antiangiogénica de TcCRT y HuCRT, son directamente proporcionales a su concentración, llegando a su máximo efecto a 1.000 ng/ml (López *et al.*, 2010), a diferencia de lo que se pudo ver en los resultados obtenidos para los efectos migratorios y proliferativos, donde rTcCRT genera mayores efectos a baja concentraciones.

Otro punto a discutir es una variable que no se pudo eliminar de este estudio, y es la concentración utilizada en ambos ensayos, ya que se utilizó una concentración en base a peso (ng/ml) la cual, no toma en cuenta la cantidad de dominios o proteína completa por nanogramo. De esta forma, es probable que la cantidad de TcCRT por nanogramo sea inferior a la cantidad de dominios N y S por nanogramo. Sin embargo, en otros estudios realizados anteriormente, también se utilizó el peso como medida de concentración (Arias *et al.*, 2015 y López *et al.*, 2010).

En síntesis, los resultados de este trabajo sugieren que 20 ng/ μ l de rTcCRT es la concentración que genera mayores efectos inductores proliferativos y migratorios en fibroblastos de rata *in vitro*. Además los resultados de esta tesis proponen que el dominio N-terminal es el dominio que posee la función pro-migratoria de la TcCRT y el dominio C, es el posible responsable de la función proliferativa de la TcCRT. Teniendo en cuenta lo anterior, se acepta la hipótesis planteada en esta tesis donde se demostró que el efecto estimulador de la proliferación y migración de fibroblastos, está determinado por distintos dominios de Calreticulina de *T. cruzi*. Sería interesante que en un futuro cercano se realizaran otros estudios donde se utilizara el dominio C para dejar en claro, y no por descarte, que es este el dominio involucrado en la inducción del efecto proliferativo celular. Por último, sería fundamental investigar el real efecto de la utilización del dominio C y N conjuntamente *in vivo* en la cicatrización cutánea, en comparación con la TcCRT completa, porque la actividad

de los péptidos *in vivo* garantiza la calidad de la evidencia científica, directamente aplicada en seres vivos.

BIBLIOGRAFÍA

ARIAS, JI; SEPÚLVEDA, C; BRAVO, P; HAMILTON-WEST, C; MALDONADO, I; FERREIRA, A. 2012. Evaluación de calreticulina humana versus calreticulina recombinante de *Trypanosomacruzi* sobre la regeneración ósea en conejos. **In:** Congreso latino americano de órganos artificiales y biomateriales. Natal, Brasil. 22-25 agosto 2012. P-9.

ARIAS, JI; SEPÚLVEDA, C; BRAVO, P; HAMILTON-WEST, C; MALDONADO, I; FERREIRA, A. 2015. Comparative effect of human and *Trypanosoma cruzi* calreticulin in wound healing. *J. Tiss. Emg. Reg. Med.* 9: 41–54.

ATIYEH, BS; HAYEK SN.; GUNN, SW. 2005. New technologies for burn wound closure and healing Review of the literatura. *Burns* 31: 944–956.

BASU, S; SRIVASTAVA, PK. 1999. Calreticulin, a Peptide-binding Chaperone of the Endoplasmic Reticulum, Elicits Tumor- and Peptide-specific Immunity. *J. Exp. Med.* Vol. 189 (5): 797–802.

BLAKYTNY, R; JUDE, E. 2006. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic Medicine.* 23:594–608.

DJOUAD, F; PLENCE, P; BONY, C; TROPEL, P; APPARAILLY, F; SANY, J; NOËL, D; JORGENSEN, C. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102(10):3837.

FERREIRA, V; CARMEN, M; VALCKA, C; ROJAS, A; AGUILAR, L; RAMIREZ, G; SCHWAEBLEB, W; FERRERIA, A. 2004. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol* 40: 1279–1291.

FOSTER, AP; CAROL, SF. 2013. Manual de dermatología en pequeños animales y exóticos. 2ª Ed. Ediciones S. Barcelona, España. 440 p.

GARDAI, SJ; MCPHILLIPS, KA; FRASCH, SC; JANSSEN, WJ; STAREFELDT, A; MURPHY-ULLRICH, JE; BRATTON, DL; OLDENBORG, P; MICHALAK, M;

HENSON, PM. 2005. Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell*, Vol. 123: 321–334.

GOLD, LI; EGGLETON, P; SWEETWYNE, MT; VAN DUYN, LB; GREIVES, MR; NAYLOR, SM; MICHALAK, M; MURPHY-ULLRICH, JE. 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB Journal*. 24(3):665-83.

HONG, SJ; JIA, SX; XIE, P; XU, W; LEUNG, KP; MUSTOE, TA; GALIANO, RD. 2013. Topically Delivered Adipose Derived Stem Cells Show an Activated-Fibroblast Phenotype and Enhance Granulation Tissue Formation in Skin Wounds. *Plos One*. 8:P-11.

LÓPEZ, NC; VALCK, C; RAMÍREZ, G; RODRÍGUEZ, M; RIBEIRO, C; ORELLANA, J.MALDONADO, I; ALBINI, A; ANACONA, D; LEMUS, D; AGUILAR, L; SCHWAEBLE, W; FERREIRA, A. 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis*.4(7):e730.

LYNCH, SE; COLVIN, RB; ANTONIADES, HN. 1989. Growth Factors in Wound Healing. Single and Synergistic Effects on Partial Thickness Porcine Skin Wounds. Vol. 84: 640-646.

MACNEAL, R. J. 2014. Structure and function of the skin. [en línea]. <http://www.merckmanuals.com/home/skin_disorders/biology_of_the_skin/structure_and_function_of_the_skin.html> [Consulta: 16-01-2015]

MARTIN, P. 1997. Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*. 276:75-81.

MATUSHANSKY, I; HERNANDO, E; SOCCI, ND; MILLS, JE; MATOS, TA; EDGAR, MA; SINGER, S; MAKI, RG; CORDON-CARDO, C. 2007. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J. Clin. Invest*. 117(11):3248.

MICHALAK, E; CORBETT, F; MESAELI, N; NAKAMURA, K; OPAS, M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J*. 344: 281–292.

MOLINA, MC; FERREIRA, V; VALCK, C; AGUILAR, L; ORELLANA, J; ROJAS, A; RAMÍREZ, G; BILLETA, R; SCHWAEBLE, W; LEMUS, D; FERREIRA, A. 2005. An *in vivo* role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. *Molecular & biochemical parasitology*. 140:133-140.

MUSTOE, TA; O'SHAUGHNESSY, K; KLOETERS, O. 2006. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 117: 35S–41S.

NANNEY, LB; WOODRELL, CD; GREIVES, MR; CARDWELL, NL; POLLINS, AC; BANCROFT, TA; CHESSER, A; MICHALAK, M; RAHMAN, M; SIEBERT, JW; GOLD, LI. 2008. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *AJP*.173(3):610-30.

PIKE, SE; YAO, L; JONES, KD; CHERNEY, B; APELLA, E; SAKAGUCHI, K; NAKHASI, H; TERUYA-FELDSTEIN, J; WIRTH, P; GUPTA, G; TOSATO, G. 1998. *JEM*. Vol. 188(12): 2349-2356.

RAMÍREZ-TOLOZA, GA; ABELLO, P; FERREIRA, A. 2016. Is the anti-tumor property of *Trypanosoma cruzi* infection mediated by its Calreticulin?. *Frontiers in Immunology*. Vol. 7 (268).

SÁNCHEZ, RE. 2011. Comparación del efecto de medios condicionados de cultivos de 2 tipos de células madre mesenquimales sobre la cicatrización de heridas en ratones. Maestría en fisiología. Santa Fé de Bogotá, Colombia. Universidad nacional de Colombia, Fac. de Medicina. 80 p.

VALENCIA, C. 2010. Cicatrización: proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. Fundación Universitaria del Área Andina-Pereira. Bogotá, Colombia. vol.12, no.20 pp. 85-98. ISSN 0124-8146.

VELÁSQUEZ, DA; PINEDA, C; CARDONA, ME; GÓMEZ, NE; GARTZ, GE; ÚSUGA, IC; TRÓCHEZ, DF; LONDOÑO, C. 2008. Soluciones terapéuticas para la

reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. Revista Ingeniería Biomédica. 2(3):77-83.

ANEXO 1



Comisión Nacional de Investigación
Científica y Tecnológica - CONICYT

N°018/FONDECYT MEDICINA G1/0001

Santiago, 10 ENE 2014

Señor
José Arias Fernández
Investigador Responsable Proyecto N°11130257
Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Depto. de Ciencias Clínicas
Santa Rosa #11735, La Pintana
Santiago

Estimado Sr. Arias:

Me dirijo a Ud. a fin de confirmarle que el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT revisó los antecedentes de su proyecto N°11130257 y consideró que se dio una adecuada respuesta a las observaciones planteadas.

Estos antecedentes pasaron a formar parte de su proyecto. Se envía copia de los Consentimientos Informados visados por este Comité para ser utilizados en su investigación.

Saluda atentamente a Ud.,

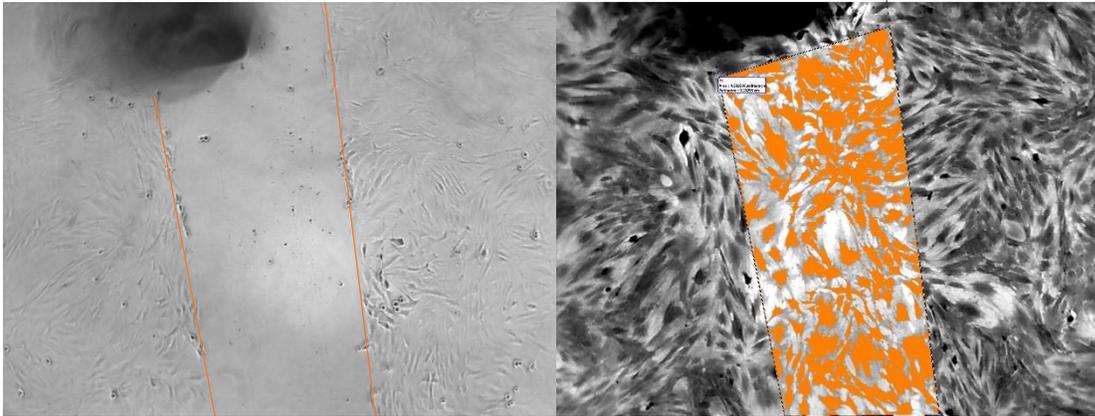

Directora Programa FONDECYT
MARIA ELENA BOISIER
Directora Programa FONDECYT


SNV/pap

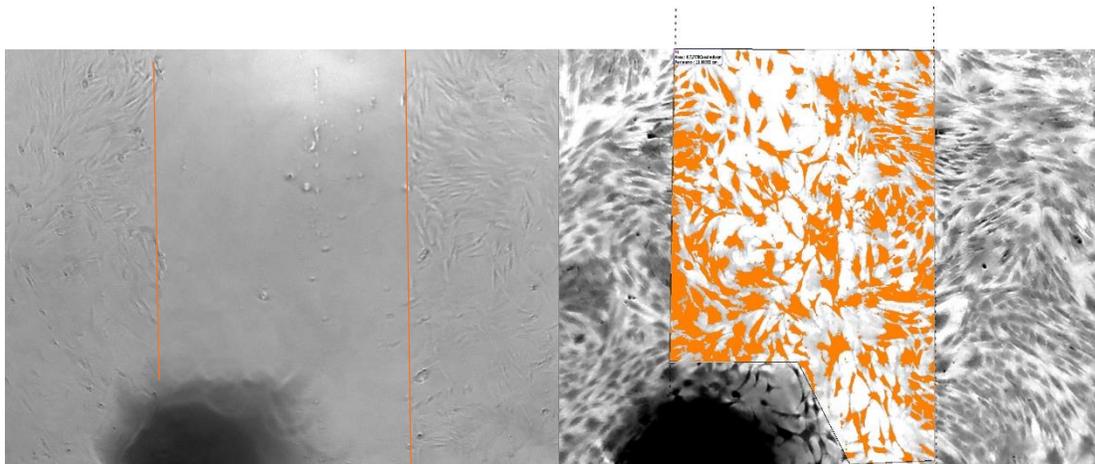


ANEXO 2

Scratch plate con dominio N:



Scratch plate control negativo:



ANEXO 3

Protocolo de curva de proliferación celular estandarizada:

En 5 microtubos se agregan concentraciones de 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 8×10^4 y 16×10^4 de fibroblastos de primer pasaje, agregando MEM (10% SFB y 1% Ab) en cantidades correspondientes para alcanzar a completar 1 ml de solución en cada microtubo, más 100 μ l de solución de MTT 0,5% y se dejan incubando (a 37°C y 5% CO₂) por tres horas. Luego se centrifugan los microtubos, se retira el sobrenadante y se reemplaza con 500 μ m de HBSS y se centrifuga nuevamente, luego se desecha el sobrenadante y se repite el lavado con HBSS y se centrifuga por tercera vez. Luego de desechar el sobrenadante se agrega 1 ml de solución de lisis (preparado 24,8 ml de DMSO, 0,150ml de HCl y 2,5 g de SDS (sodium dodecyl sulfate)) y sonicar por cinco minutos. Luego en la placa de ELISA se colocan 200 μ l/pocillo de la solución resultante y se lee con el Lector de ELISA a 550 nm.