



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**EFFECTO DE LA CALRETICULINA DE *Trypanosoma
cruzi* EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE
DERIVADAS DE TEJIDO ADEIPOSO DE RATA**

ALEJANDRA GUERRERO MONCAYO

**Tesis para optar al Título de Médico Veterinario y Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias**

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ IGNACIO ARIAS FERNÁNDEZ

Santiago-Chile

2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, a mis padres y a mi hermano a quienes amo, por acompañarme en este largo proceso, con amor, comprensión, paciencia, mucho apoyo y oración. Gracias a mi familia en Colombia que siempre me acompañó a la distancia.

Agradezco también la paciencia y el apoyo que me brindó mi profesor guía, José Ignacio Arias, a través de sus palabras de aliento y sus consejos académicos, profesionales y personales. Por las oportunidades que me brindó y la confianza que depositó en mí. Muchas gracias a Tía Sole, María Soledad Fernández, que me enseñó mucho de lo necesario para el desarrollo de esta tesis, además de entregarme cariño y ánimo todos los días, con una sonrisa.

Muchas gracias al Dr. Christopher Hamilton-West, Dr. Cristian Torres, Dr. Oscar Peralta y Dra. Galia Ramírez por su ayuda y correcciones.

Quiero agradecer a todos mis compañeros y profesores de los laboratorios CIMAT, BIOVETEC y BiMre, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, corregirme y a explicarme con toda calma y paciencia sin importar cuántas veces preguntara.

Por otro lado, a los amigos veteranos siempre incondicionales que con una palabra de ánimo y cariño o un consejo siempre estuvieron ahí. Y a mis amigas del colegio que me alegran la vida y siempre comprendieron mi falta de tiempo y mi estrés, sin entender mucho de lo que hacía.

Finalmente, y, por cierto, no menos importante, a Nicolás Ostornol, mi compañero en las duras y en las maduras. Gracias por tu inmenso amor y tu capacidad de sacarme de mis peores estados ánimo en estos años de larga tesis.

Dedico todo este trabajo a mis abuelos que extraño con mi vida y que son en este momento, los más orgullosos de este logro, acompañándome desde arriba.

Gracias

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen.....	1
2. Summary.....	2
3. Introducción.....	3-4
4. Revisión Bibliográfica.....	5-12
5. Hipótesis.....	13
6. Objetivo General.....	13
7. Objetivos Específicos.....	13
8. Materiales y Métodos.....	14-23
9. Resultados.....	24-33
10. Discusión.....	34-39
11. Conclusiones.....	40
12. Referencias Bibliográficas.....	41-45
13. Anexos.....	46

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Secuencias de los partidores utilizados para el análisis de PCR.....	22
Figura 1. Morfología celular visualizada a través de microscopía invertida.	24
Figura 2. Tinción histoquímica específica para cada linaje de diferenciación de ADSC.....	25
Figura 3. Electroforesis de genes específicos de linajes de diferenciación y gen constitutivo β -ACTINA en ADSC.....	26
Figura 4. Tinción histoquímica específica para cada linaje de diferenciación de ADSC.....	27
Figura 5. Electroforesis de genes específicos de linajes de diferenciación y gen constitutivo β -ACTINA en ADSC.....	28
Figura 6. Tinción histoquímica específica para cada linaje de diferenciación de ADSC.....	29
Figura 7. Electroforesis de genes específicos de linajes de diferenciación y gen constitutivo β -ACTINA en ADSC.....	30
Figura 8. Tinción tricrómica de Mallory.....	31
Figura 9. Electroforesis de genes específicos de linaje y gen constitutivo β -ACTINA en ADSC.....	32

1. RESUMEN

La calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rTcCRT) aplicada tópicamente es más efectiva que su contraparte humana en inducir proliferación y migración fibroblástica *in vitro*, correlacionándose con los efectos *in vivo* de esta proteína, la cual estimula un cierre acelerado de heridas en piel de ratas.

Para estudiar una de las posibles vías por la cual podría ocurrir este proceso, se analizó la influencia directa de rTcCRT sobre la diferenciación a fibroblastos a partir de células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC) subcutáneo, adyacente a la herida. Para esto, se propuso detectar la expresión de genes fibrogénicos específicos en ADSC, en presencia de rTcCRT, *in vitro*.

Las ADSC de rata fueron aisladas y cultivadas para comprobar el potencial multilínea a linaje osteogénico, adipogénico y fibrogénico. La diferenciación a cada linaje a través de tinción histoquímica y RT-PCR, a las cuatro semanas.

Por otro lado, se cultivaron ADSC en medio de cultivo suplementado con rTcCRT para observar el potencial efecto diferenciador a fibroblastos. Su detección se realizó a través tinción tricrómica de Mallory luego de cuatro semanas, revelando la presencia de fibras colágenas, con patrones similares a aquellos obtenidos en los controles positivos de fibroblastos dérmicos de rata. Se utilizó RT-PCR para identificar la expresión de genes fibrogénicos, mostrando una significativa expresión de genes fibrogénicos en las ADSC suplementadas con rTcCRT y una expresión no detectable en las ADSC control sin suplementar.

Palabras clave: CRT, ADSC, diferenciación fibrogénica, TcCRT.

2. SUMMARY

Recombinant *Trypanosoma cruzi* calreticulin (rTcCRT) topically applied is more efficient than its human counterpart on its capacity to increase fibroblastic proliferation and migration *in vitro*, and correlates with an accelerated rat skin wound healing process *in vivo*.

To study one of the possible pathways by which this process occurs, the direct influence of rTcCRT in the differentiation to fibroblasts of the subcutaneous population of rat adipose derived stem cells (ADSC) surrounding the wound, was analyzed. For this purpose, we detected the expression of specific fibrogenic genes in rTcCRT-supplemented ADSC, *in vitro*.

Rat ADSC were obtained and cultured to analyze their multilineage potential to osteogenic, adipogenic and fibrogenic lineages. The differentiation was detected through histological staining and RT-PCR, after four weeks of culture.

On the other hand, ADSC were cultured in supplemented growth medium supplemented with rTcCRT to observe the fibroblast differentiation-effect. The detection was accomplished by Mallory's trichrome staining direct histology after four weeks of culture, revealing the presence of collagen fibers with similar staining patterns to those obtained with rat skin fibroblasts primary cultures as positive controls. RT-PCR was also used to identify the expression of fibrogenic genes, showing significative expression of fibrogenic genes in the rTcCRT-supplemented ADSC and no detectable expression in ADSC negative control cultures.

Keywords: CRT, ADSC, fibrogenic differentiation, TcCRT.

3. INTRODUCCIÓN

En el proceso de cicatrización se presentan problemas como las heridas crónicas. Durante los últimos años se han utilizado tratamientos estándares para estas problemáticas, entre los cuales se encuentran: descompresión de heridas, injertos de piel, oxígeno hiperbárico, vendajes, debridamiento y antibióticos. Sin embargo, incluso con la mayoría de las terapias actuales, más del 50% de las heridas crónicas son refractarias a estos tratamientos (Hanson *et al.*, 2010).

La medicina regenerativa ha desarrollado nuevas estrategias para el tratamiento de éstas, como por ejemplo el uso de células madre, factores de crecimiento y biomateriales (Gimble *et al.*, 2007). Sin embargo, las opciones de tratamiento actuales para heridas crónicas y quemaduras, son limitadas y no siempre efectivas, a pesar de los avances significativos en el cuidado de heridas, incluyendo la aplicación de equivalentes de piel y factores de crecimiento (Hanson *et al.*, 2010). El uso de factores de crecimiento para el tratamiento de heridas es controversial, ya que existe tan solo un factor de crecimiento aprobado por la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos, EE.UU.), conocido como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual posee un alto costo de tratamiento y requiere de altas concentraciones para generar sus efectos (Goldman, 2004; Okabe *et al.*, 2013). Paralelamente, se ha estudiado el uso de moléculas que promuevan la reparación de heridas en piel. Este es el caso de la proteína calreticulina (CRT), una proteína chaperona del retículo endoplásmico y reguladora de la homeostasis del calcio dentro de la célula. CRT ha sido utilizada en bajas concentraciones de forma tópica en heridas de piel, en modelos experimentales porcinos y murinos, promoviendo la rápida reparación de la dermis y epidermis (Nanney *et al.*, 2008; Michalak *et al.*, 2009; Gold *et al.*, 2010). Estudios recientes determinaron que al comparar el efecto reparativo entre CRT recombinante de humanos (rHuCRT) y

CRT recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rTcCRT), la proteína parasitaria fue más efectiva que su contraparte humana (Arias *et al.*, 2015). A pesar de los conocidos efectos de CRT sobre la reparación de heridas en piel, aún se desconoce la cadena de eventos a través de los cuales CRT cumple la función de acelerar la cicatrización de las heridas. Una posible vía por la cual podría ocurrir este proceso, sería la influencia de CRT sobre la diferenciación a fibroblastos de células madre presentes en el tejido adiposo subcutáneo de una herida abierta.

Para esto, se propone detectar la diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC) a linaje fibrogénico, en presencia de rTcCRT. Utilizando rTcCRT, una proteína con un potente efecto reparativo a muy bajas concentraciones para obtener los efectos reparativos de CRT.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La primera función de la piel es servir como barrera protectora frente al medio ambiente. Por lo tanto, la pérdida de integridad de largas porciones de piel, como resultado de una lesión o enfermedad, puede conducir a una gran invalidez o incluso a la muerte (Singer y Clark, 1999).

Los principales objetivos del tratamiento de heridas en piel, son el cierre rápido de la herida y una cicatriz funcional y estéticamente satisfactoria, lo que se logra mediante un proceso complejo, dinámico e interactivo que involucra mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células del parénquima (Singer y Clark, 1999). El modelo clásico de cicatrización de heridas se divide en tres fases secuenciales que se superponen en el tiempo y espacio: inflamación, proliferación, maduración y remodelación (Menendez *et al.*, 2014). La curación o cicatrización exitosa de una herida depende del funcionamiento óptimo y oportuno de todos estos participantes. Si una herida no cicatriza en una secuencia ordenada y oportuna, o si el proceso de curación no da lugar a una integridad estructural, entonces la herida es considerada crónica. Las heridas que no cicatrizan se mantienen en un constante estado inflamatorio, porque no logran progresar a las etapas normales de la cicatrización de heridas (Singer y Clark, 1999; Hanson *et al.*, 2010; Menendez *et al.*, 2014). Las causas de estas alteraciones en la cicatrización son variadas, desde malnutrición hasta condiciones metabólicas y enfermedades.

Las modalidades terapéuticas estándares para el tratamiento de heridas incluyen: debridamiento, descargas de presión, vendajes, oxígeno hiperbárico, antibióticos y factores de crecimiento tópicos. Sin embargo, incluso con la mayoría de las terapias actuales, más de un 50% de las heridas crónicas se mantienen refractarias al tratamiento y se requiere de nuevas terapias en esta área para acelerar y optimizar los resultados en los pacientes (Hanson *et al.*, 2010, Isakson *et al.*, 2015). Apuntando a estas nuevas estrategias de

tratamiento para el manejo y cicatrización de heridas, se ha desarrollado la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa como una ciencia multidisciplinaria, que ha evolucionado en paralelo con los recientes avances biotecnológicos, combinando biomateriales, factores de crecimiento y células madre para reparar tejidos y órganos dañados (Gimble *et al.*, 2007).

Actualmente, el estudio de células madre ha tenido un crecimiento significativo. Sin embargo, no se cuenta con una técnica estándar para su obtención ni con una nomenclatura aceptada universalmente (Flores–Figuroa *et al.*, 2006). Las células madre han sido definidas como células que poseen la capacidad de replicarse y diferenciarse dando lugar a diversos tipos de células especializadas. Se pueden clasificar de tres maneras: a) según su potencial de diferenciación en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales; b) según el tejido de origen en células madre embrionarias o adultas, y c) según su capacidad de re-población tisular *in vivo* en corto, medio o largo plazo de regeneración (Rodríguez-Pardo, 2005). El término célula madre mesenquimal o célula troncal mesenquimal (*mesenchymal stem cell* en inglés) fue utilizado por primera vez por Caplan en la década de los 90s, en donde se refiere a células adultas progenitoras/troncales adherentes al plástico, provenientes de médula ósea. Originalmente, se refirieron a estas células como unidades formadoras de colonia fibroblastoides, luego en la literatura hematológica, como células madre/troncales del estroma medular, más tarde como célula madre mesenquimal y más recientemente, como células estromales mesenquimales multipotentes (MSC) (Fraser *et al.*, 2008). Incluso, hoy en día, se considera que la multipotencialidad no tiene importancia para los tratamientos clínicos que se proponen con MSC. Sin embargo, sí es de importancia su capacidad inmunomoduladora y trófica, por lo tanto, se ha sugerido llamar a las MSC: células de señalización medicinal, manteniendo sus siglas en inglés (MSC; *medicinal signaling cells*) (Caplan y Correa, 2011).

En este trabajo, nos referiremos a las MSC como células madre mesenquimales. Estas células con sus propiedades únicas de autorenovarse y diferenciarse, emergen como un candidato prometedor para la terapia celular en heridas crónicas. Sin embargo, su uso ha sido obstaculizado por la falta de protocolos estandarizados para la caracterización celular, aislamiento y trasplante (Isakson *et al.*, 2015).

Cabe señalar que existen otros factores que deben ser tomados en consideración cuando se discuten nuevas terapias celulares para heridas crónicas, como lo son la preparación del lecho de la herida, la técnica de aplicación, el momento del tratamiento y el mecanismo de traslado de las células madre mesenquimales al lecho de la herida (Hanson *et al.*, 2010).

En el caso de tratamientos con factores de crecimiento, han ganado popularidad mundial, principalmente en cirugía plástica y reconstructiva. Este es un método efectivo para promover la cicatrización de heridas, donde se han utilizado variados factores de crecimiento. Sin embargo, existe solo un factor de crecimiento aprobado por la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos, EE.UU.), que corresponde al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Sin embargo, posee algunas desventajas, tales como una alta concentración requerida para lograr su acción y un alto costo en el mercado (Goldman, 2004; Okabe *et al.*, 2013).

Paralelamente a estas nuevas estrategias de tratamiento para el manejo y cicatrización de heridas, se han dirigido esfuerzos al uso de proteínas exógenas. Entre las proteínas que están siendo utilizadas en el campo de la cicatrización de piel, encontramos la calreticulina (CRT), una proteína presente en el retículo endoplásmico, de 46 kDa, quelante de calcio y altamente conservada. Entre sus funciones intracelulares se encuentran, la regulación de la homeostasis del calcio en la célula y la función chaperona en la producción de otras moléculas (Michalak *et al.*, 2009). Sus funciones extracelulares

continúan siendo reveladas, entre las que se encuentran la inhibición de la neovascularización, control del crecimiento de células tumorales, inhibición del complemento, la cicatrización de heridas cutáneas y diversos procesos reparativos, haciendo de ésta, una proteína de fuerte impacto en procesos de desarrollo fisiológico y patológico (Nanney *et al.*, 2008). Estudios previos han concluido que la aplicación tópica de CRT humana exógena aumenta la reparación de heridas cutáneas en modelos porcinos, murinos sanos y murinos diabéticos (Nanney *et al.*, 2008; Gold *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha estudiado la CRT del parásito *Trypanosoma cruzi* (TcCRT), responsable de la enfermedad de Chagas, un protozoo flagelado que realiza etapas de su ciclo intracelular y extracelularmente. En el año 1991, se identificó por primera vez la TcCRT (Ramos *et al.*, 1991). Una característica distintiva del ciclo de vida de este parásito es su capacidad para adaptarse a la fisiología tanto de sus hospederos invertebrados como de sus hospederos vertebrados. Esta habilidad incluye la adaptación a cambios de temperatura, pH y las estrategias de defensa por parte del hospedero. Esta capacidad adaptativa es particularmente propia de los endoparásitos y específicamente de los parásitos intracelulares, considerando que los parásitos varían desde protozoos hasta artrópodos (Ferreira *et al.*, 2004). TcCRT participa en varias interacciones hospedero-parásito de *T. cruzi*, describiéndola como una proteína con efectos anti-angiogénicos y anti-tumorales (Ramírez *et al.*, 2011; Arias *et al.*, 2015).

HuCRT posee una similitud de un 50% aproximadamente con TcCRT (Ferreira *et al.*, 2004). Sin embargo, estudios realizados *in vitro*, demostraron diferencias importantes en el efecto obtenido por las moléculas recombinantes de TcCRT (rTcCRT) y HuCRT (Arias *et al.*, 2015). Como resultado, se obtuvo que, para la migración de fibroblastos, rTcCRT necesita 2.500 veces menos concentración que rHuCRT para obtener el mismo resultado en pruebas de cicatrización de la herida *in vitro* (Arias *et al.*, 2015). Al analizar la proliferación de fibroblastos *in vitro*, rTcCRT necesitó 4.000 veces menos concentración que la rHuCRT para

obtener resultados equivalentes. Estos efectos diferenciales *in vitro* se correlacionan con aquellos efectos obtenidos *in vivo* en la promoción de la reparación dérmica y epidérmica en heridas experimentales en ratas. Por lo anterior, se concluyó que la rTcCRT es más efectiva que la rHuCRT en el aumento de la migración de fibroblastos humanos y en la promoción de la proliferación celular (Arias *et al.*, 2015). Previamente, se ha demostrado que la CRT exógena acelera la reparación de las heridas, modulando los dos procesos más importantes requeridos para una reparación adecuada y eficiente: la re-epitelización de la herida y la formación de tejido neodérmico de granulación (Nanney *et al.*, 2008). La proteína aumenta la tasa de re-epitelización, muestra un mayor grado de estratificación epidérmica y mayor cantidad de tejido de granulación. Las heridas tratadas con CRT reparan más tempranamente que las heridas tratadas con buffer o PDGF-BB y exhiben un epitelio más maduro y estratificado. La restauración del tejido dérmico es un proceso dinámico y esencial para la remodelación del lecho de la herida (Nanney *et al.*, 2008). La formación del tejido neodérmico conectivo es mediada en gran parte por fibroblastos reclutados hacia la herida. Los fibroblastos migran, proliferan y producen proteínas de matriz extracelular que rellenan la herida y proveen el andamiaje para la migración de los queratinocitos, esenciales para la re-epitelización. La CRT induce una sobreexpresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y un aumento en el número de fibroblastos en la reparación de la dermis (Nanney *et al.*, 2008). El TGF- β es conocido por sus efectos inductores en la mayoría de las proteínas de matriz, necesarias para la adhesión y migración de las células y podría también ser responsable de la aceleración en la curación de la herida (Nanney *et al.*, 2008). Por lo tanto, el rol de la CRT en los procesos de reparación ha sido bien establecido y se ha reportado un efecto positivo de la CRT en los procesos de reparación epidérmica y dérmica, en la proliferación y migración de fibroblastos,

promoviendo el cierre acelerado de la herida y el aumento en la cantidad de tejido de granulación (Arias *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la participación de fibroblastos y queratinocitos que migran al sitio de la herida, y el rol que cumpliría CRT en este proceso, surge la interrogante de dónde provienen estos fibroblastos que aumentan en número. Es así como, se propone investigar la capacidad que podría tener CRT en influenciar la diferenciación de la población de MSC presentes en el tejido adiposo subcutáneo adyacente a la herida a fibroblastos.

A lo largo de los años se ha aislado y cultivado exitosamente MSC y se ha explorado el uso de éstas para reparación e ingeniería de tejidos (Caplan y Correa, 2011). Las MSC, como se mencionó anteriormente, son una población celular que exhibe una extensa capacidad proliferativa y habilidad para generar multilíneas de tejido conectivo (óseo, cartílago, tendón, grasa, etc.) (Caplan y Correa, 2011). Las MSC son la población celular mejor descrita que exhibe estas características y varios estudios han reportado la distribución ubicua de MSC en diferentes tejidos y órganos, incluyendo la médula ósea, músculo, cerebro, piel y grasa (Zuk *et al.*, 2001; Tholpady *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2008). Muchos nombres han sido utilizados para describir a esta población celular de tejido adiposo, adherente al plástico, obtenida a través de digestión enzimática que se caracteriza por una extensa capacidad proliferativa y diferenciación multilínea. Entre ellos se encuentran: células madre/estromales derivadas de tejido adiposo, células madre/estromales adultas derivadas de tejido adiposo, células estromales adiposas, células madre mesenquimales adiposas, células madre multipotentes derivadas de tejido adiposo humano, lipoblastos, pericitos, preadipocitos y células de lipoaspirado procesado (Gimble *et al.*, 2007; Fraser *et al.*, 2008).

En este trabajo nos referiremos a estas células como células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC; *adipose-derived stem cells* en inglés).

Las ADSC utilizadas para investigación son fácilmente extraídas del tejido removido a través de procedimientos de aspiración bajo la piel o de liposucción cosmética electiva, pero también pueden ser obtenidas desde tejido resecado (Tholpady *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2008). Los humanos poseen abundantes depósitos de grasa subcutánea. Sin embargo, el uso de modelos animales es esencial para el desarrollo de la investigación y la mayoría de éstos posee muy poca grasa subcutánea. Es por esto que, se investigó la presencia de ADSC en la grasa visceral de ratas. Como resultado, se comprobó la presencia de las ADSC y su potencial multilineaje, a través de la inducción a diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos, células nerviosas y condrocitos *in vitro*, tal como ha sido demostrado en células madre derivadas de grasa subcutánea en humanos (Tholpady *et al.*, 2003).

Para probar el efecto que podría ejercer CRT en la diferenciación de ADSC del tejido adiposo subcutáneo adyacente a una herida, se utilizarán ADSC provenientes de grasa subcutánea y visceral de rata.

Como se mencionó anteriormente, con respecto al efecto acelerador en la cicatrización por parte de CRT, la TcCRT es más eficiente a bajas concentraciones en generar los efectos reparativos que su contraparte humana. Es por esto que, pensando en una alternativa terapéutica futura para el tratamiento de heridas abiertas, agudas y crónicas, sería ideal el uso de CRT parasitaria, considerando las bajas concentraciones que se requieren para evidenciar resultados. El estudio de este posible mecanismo de acción contribuye al desarrollo en la investigación de esta proteína para su posterior uso, no solo en el manejo de heridas en animales, sino también en humanos.

En este estudio se propone demostrar que las ADSC de rata, se diferencian a fibroblastos, expresando genes propios de este tipo celular, por efecto de TcCRT *in vitro*. Y para demostrarlo se utilizó rTcCRT, considerando las bajas

concentraciones que se requieren para lograr su efecto reparador en comparación a las otras proteínas estudiadas al día de hoy.

5. HIPÓTESIS

Calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rTcCRT) induce la expresión de genes de linaje fibrogénico en células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC) de rata, *in vitro*.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto rTcCRT sobre la expresión *in vitro* de genes de linaje fibrogénico en ADSC de rata.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar ADSC de rata desde tejido adiposo subcutáneo y visceral.
2. Comprobar el potencial multilinaje *in vitro* de ADSC de rata en medios inductores de diferenciación.
3. Medir la expresión de genes específicos de linaje fibrogénico en ADSC de rata en presencia de rTcCRT *in vitro*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos mencionados en este proyecto de tesis formaron parte del proyecto FONDECYT 11130257 y contaron con la aprobación del Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 1).

Se utilizaron tres ratas blancas *Sprague-Dawley* macho de 200-300g de peso, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, para la obtención del tejido adiposo.

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio CIMAT del Departamento de Biología Animal y en el Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa (BiMre) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

8.1. Aislamiento y cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo

Las ADSC de grasa visceral y subcutánea extraídas para este experimento tienen una demostrada capacidad de diferenciarse a diferentes tipos celulares, tales como grasa, hueso, cartílago y músculo (Tholpady *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 2008).

Para la obtención de las células, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano y, a través de una técnica quirúrgica aséptica, se retiraron las almohadillas de grasa inguinal, epididimal y del omento, de acuerdo a los protocolos ya descritos para esta especie (Gimble *et al.*, 2007; Tholpady *et al.*, 2003). Luego de extraída la grasa, las ratas se sacrificaron con tiopental sódico al 5% vía intracardiaca.

La grasa recolectada fue lavada con volúmenes equivalentes de buffer fosfato salino (PBS) con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomina y 0,25 µg/mL de anfotericina B) (HyClone, South Logan, Utah, EE.UU.) para remover células contaminantes. Luego, el tejido se incubó en 1 mL de colagenasa al 0,5% (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.) por gramo de grasa a 37° C por 45 min con agitación constante. La reacción enzimática se inactivó con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-HG), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone, South Logan, Utah, EE.UU.) equivalente al volumen de colagenasa. La solución se filtró con un filtro de poros de 100 µm para remover el tejido no digerido y se centrifugó a 770 G por 7 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante (Vieira *et al.*, 2010). De este modo, se obtuvo la población flotante de adipocitos maduros de la fracción vascular estromal peletizada (SVF) que corresponde a una población celular heterogénea, incluyendo células sanguíneas circulatorias, fibroblastos, pericitos, células endoteliales y “preadipocitos” o progenitores de adipocitos. Luego de obtenida la SVF, se resuspendió en 15 mL de DMEM-HG suplementado con 10% SFB y se filtró con filtro de 60 µm para remover detritos (Gimble *et al.*, 2007). El aislamiento de las células se realizó basado en la capacidad descrita que presentan las ADSC para adherirse a botellas de plástico bajo condiciones de cultivo en monocapa (Dominici *et al.*, 2008). Las células presentes en el resuspendido se contabilizaron en un hemocitómetro de Neubauer y se sembraron en botellas de cultivo de 75 cm² (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) en una concentración de 1.000-3.500 células/cm² en DMEM-HG suplementado con 10% SFB, 1% de solución antibiótica y antimicótica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomina 10.000 ug/mL, anfotericina B 35 ug/mL) (todos de HyClone, South Logan, Utah, EE.UU.) (Gimble *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2010).

Las células fueron incubadas a 37° C con 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada dos días y monitoreadas periódicamente con un microscopio

invertido TMS-F (Nikon, Tokyo, Japón). Cuando las células lograron aproximadamente un 70-80% de confluencia, fueron recolectadas con Tripsina-EDTA 0,25% (HyClone, South Logan, Utah, EE.UU.), contadas y sembradas en botellas de cultivo de 25 cm² a una densidad de 5.000 células/cm². Los cultivos fueron tripsinizados repetidamente al lograr una confluencia de un 70-80% para luego preservar las células en medio de criopreservación (10% dimetilsulfóxido, 60% DMEM-HG y 30% SFB) a concentraciones de 6×10^5 células/cryovial y congeladas a -80° C por períodos cortos de tiempo y en nitrógeno líquido por períodos más prolongados (Gimble *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2010).

Los protocolos de diferenciación de las ADSC para los diferentes linajes han sido descritos previamente en ratas (Tholpady *et al.*, 2003) y otras especies, tales como caninos (Vieira *et al.*, 2010), y humanos (Zuk *et al.*, 2001). Para comprobar el potencial de diferenciación multilínea, en este estudio, las ADSC obtenidas del tejido adiposo de ratas fueron diferenciadas a los linajes mesenquimales: osteogénico, adipogénico y fibrogénico.

Para comprobar el potencial multilínea las ADSC fueron evaluadas utilizando métodos cualitativos y semicuantitativos.

8.2. Diferenciación osteogénica

Las células aisladas del tejido adiposo de ratas fueron sembradas en botellas de cultivo de 25 cm² (Orange Scientific, Braimne-l'Alleud, Bélgica) a una concentración de 2×10^4 células por botella. El medio de cultivo control consistió en α -MEM (HyClone, South Logan, Utah, EE.UU.) suplementado con 10% de SFB, 1% de solución antibiótica y antimicótica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomycin 10.000 ug/mL, anfotericina B 25 ug/mL) (HyClone, South Logan, Utah, EE.UU.). El medio de diferenciación consistió en el medio de cultivo control suplementado con 1 μ M de dexametasona, 10 mM de β -glicerofosfato, 2

mM de L-glutamina y 50 μ M de ácido ascórbico (todos de Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.). Los medios de cultivo experimental y control fueron cambiados cada tres días.

Las células fueron extraídas al día 28 y analizadas para la expresión de β -*ACTINA* y *OSTEONECTINA* a través de RT-PCR. El nivel de diferenciación osteogénica fue analizada al día 28, a través de la visualización de depósitos de minerales en el cultivo celular por medio de tinción von Kossa.

8.3. Diferenciación adipogénica

Las células aisladas del tejido adiposo de las ratas fueron sembradas en medio control y de diferenciación en botellas de cultivo de 25 cm² con 2 x 10⁴ células por botella. El medio control consistió en DMEM-HG suplementado con 10% SFB, 1% de solución antibiótica y antimicótica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomycin 10.000 ug/mL, anfotericina B 25 ug/mL). El medio de diferenciación consistió en medio control suplementado con 1 μ M dexametasona, 0,5 mM indometacina (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.), 10 μ g/mL insulina (Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU.) y 100 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.). Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación por tres días y luego en medio de mantención de diferenciación por tres días, consistente en DMEM-HG, 10% SFB, 1% de solución antibiótica y antimicótica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomycin 10.000 ug/mL, anfotericina B 25 ug/mL) suplementada con 10 μ g/mL insulina (Bosnakovski *et al.*, 2005).

Las células fueron extraídas al finalizar el período de 28 días y fueron analizadas para la expresión de β -*ACTINA* y *PPAR γ 2* (receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma 2) a través de RT-PCR. El grado de diferenciación adipogénica fue analizado cumplidos los 28 días de cultivo a través de la

visualización de vacuolas de grasa en los cultivos celulares por medio de la tinción Oil Red O.

8.4. Diferenciación fibrogénica

Las células aisladas del tejido adiposo de las ratas fueron sembradas en medio de control y de diferenciación en botellas de cultivo de 25 cm² a una concentración de 2 x 10⁴ células/botella.

El medio control consistió en DMEM-HG suplementado con 10% de SFB y 1% de solución antibiótica y antimicótica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10.000 ug/mL, anfotericina B 35 ug/mL). El medio de diferenciación consistió en el medio control suplementado con 50 ng/mL de factor de crecimiento de tejido conectivo recombinante humana (CTGF) (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EE.UU.) (Lee *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2011). Los medios de cultivo experimental y control fueron cambiados cada tres días.

Se obtuvieron células al día 28 para el análisis de la expresión de β -ACTINA, TN-C (Tenascina-C) y MMP1 (metaloproteinasa de matriz extracelular 1), a través de RT-PCR. El nivel de diferenciación fue analizado a los 28 días a través de la visualización de fibras colágenas con la tinción tricrómica de Mallory.

8.5. Cultivo de células suplementadas con rTcCRT

Las células obtenidas del tejido adiposo de las ratas fueron sembradas en botellas de cultivo (2 x 10⁴ células/botella) en medio suplementado y en medio control. El medio control consistió en DMEM-HG suplementado con 10% de SFB y 1% de solución antibiótica y antimicótica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10.000 ug/mL, anfotericina B 35 ug/mL). El medio suplementado

con rTcCRT consistió en el medio control con 10 ng/mL de rTcCRT (Arias *et al.*, 2012). Los medios de cultivo experimental y control fueron cambiados cada tres días.

Se obtuvieron células al día 28 para el análisis de la expresión de β -ACTINA, TN-C y MMP1 a través de RT-PCR. El nivel de diferenciación a linaje fibrogénico fue analizado a los 28 días a través de la visualización de fibras colágenas con la tinción tricrómica de Mallory.

La rTcCRT fue proporcionada gentilmente por el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM) del Dr. Arturo Ferreira en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

8.8. Tinción von Kossa

La presencia de depósitos minerales en los cultivos celulares de 28 días fue detectada utilizando tinción von Kossa. Las células cultivadas en monocapa en botellas de 25 cm² fueron fijadas con formalina al 10% y luego incubadas en solución de nitrato de plata al 2% y posteriormente, expuestas a luz directa por 20 minutos. Las botellas fueron lavadas con agua destilada e incubadas con tiosulfato de sodio al 5% por 3 minutos para luego lavarlas con agua destilada y contra teñir con fucsina ácida por 5 minutos. Las muestras fueron visualizadas y las imágenes fueron capturadas con un microscopio invertido TMS-F (Nikon, Tokyo, Japón).

8.9. Tinción Oil red O

La presencia de vacuolas lipídicas fue detectada utilizando tinción Oil red O en las células diferenciadas y control al cumplir 28 días de cultivo. Las células fueron fijadas con formalina al 10%, luego fueron lavadas con agua destilada e

incubadas por 5 minutos con isopropanol 60%. Se removió el isopropanol y se incubó por 5 minutos en la solución de Oil red O. Luego se realizó contra tinción con hematoxilina por 1 minuto y transcurrido el tiempo, las botellas se lavaron con agua corriente. Las muestras fueron visualizadas y las imágenes fueron capturadas con un microscopio invertido TMS-F (Nikon, Tokyo, Japón).

8.10. Tinción tricrómica de Mallory

La presencia de fibras colágenas en los cultivos celulares fue visualizada a través de tinción tricrómica de Mallory en las células cultivadas por 28 días. Luego de fijar las células con formalina 10%, las botellas se lavaron con agua destilada y fueron incubadas en tiosulfato de sodio 5% por 3 minutos. Transcurrido el periodo, se lavaron con agua corriente y luego con agua destilada para contra teñir con fucsina ácida 1% por 5 minutos. Luego se eliminó el colorante y se incubó con azul-orange G por 20 a 30 minutos. Las muestras fueron visualizadas y las imágenes fueron capturadas con un microscopio invertido TMS-F (Nikon, Tokyo, Japón).

8.6. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las células fueron extraídas mediante tripsinización con Tripsina-EDTA 0,25% y centrifugadas a 770 G para obtener un pellet celular. Luego de obtenido el pellet celular se agregó *Buffer RLT (RNeasy Mini Kit)* (Qiagen, Hilden, Alemania) junto con β -mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Alemania) y se prosiguió según el protocolo otorgado por el fabricante.

La concentración y pureza del ARN total de cada muestra fue determinada usando el espectrofotómetro *Epoch Microplate* (BioTek, Winooski, Vermont, EE.UU.). Posterior a la cuantificación, el ARN fue tratado con *DNase I (RNase-*

free) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.) para eliminar el ADN genómico contaminante.

La síntesis de ADNc se realizó a través de la reacción de transcripción reversa (RT) con el Reverse Transcription System (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) según los protocolos del fabricante.

8.7. RT-PCR

Para el PCR, los partidores fueron adquiridos en IDT (Coralville, Iowa, EE.UU.) (Tabla 1). Cada reacción de PCR (20 μ L) se realizó con: 2,5 μ L de 10x *Paq5000 Reaction Buffer*, 0,2 μ L de 100 mM *dNTP mix* (25 mM cada dNTP), 1,25 U de *Paq5000 Polymerase DNA* (todos de Qiagen, Hilden, Alemania), (5 U/ μ L) 0,5 μ L de 10 μ M partidador directo (IDT), 0,5 μ L de 10 μ M partidador reverso (IDT), 1 μ L de ADNc como templado, y agua libre de nucleasas (Qiagen) hasta el volumen final de 20 μ L.

La reacción de amplificación de PCR fue realizada en el *PCR Express Thermal Cycler* (Thermo Hybaid, Ashford, Kent, Inglaterra). Las condiciones de reacción de PCR consistieron en: una denaturación inicial de 2 minutos a 95° C, seguido de 30 ciclos de denaturación por 20 segundos a 95° C, un ciclo de alineamiento por 20 segundos a la temperatura correspondiente para cada partidador, una extensión de 30 segundos a 72° C, una extensión final de 5 minutos a 72° C y enfriamiento a 4° C.

Tabla 1. Secuencias de los partidores utilizados para el análisis de PCR

	Partidor directo	Partidor reverso	Tamaño esperado (pb)
<i>PPARγ2</i>	5'-GGTGAAACTCTGGGAGATCC-3'	5'-TGAGGGAGTTTGAAGACTCTTC-3'	400
<i>OSN</i>	5'-GCAAGGTGTGTGGGAGAGAG-3'	5'-CGCAAAGAAGTGGCAGGAAGAG-3'	140
<i>TN-C</i>	5'-ATGTTGAATGGCGACAC-3'	5'-CGGTCTCAAACCCAG-3'	188
<i>MMP-1</i>	5'-TTGGCTTCCTAGCAGTGTG-3'	5'-TCGGAGGCTAAATCTGCGTT-3'	248
β - <i>ACTINA</i>	5'-GCGCAAGTACTCTGTGTGGA-3'	5'-CATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	89

(Han *et al.*, 2006; Tholpady *et al.*, 2003; Islam *et al.*, 2014)

Los fragmentos amplificados de ADNc se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa horizontal al 2% teñido con 0,05 μ L/mL de *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* 10.000X en DMSO (Biotium, Hayward, California, EE.UU.). Los productos de PCR fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (Wealtec, Sparks, Nevada, EE.UU.). Todas las muestras fueron procesadas al RT-PCR. Los niveles de expresión de ARNm fueron normalizados según el contenido de β -*ACTINA* en el ARNm de las muestras. Para comparar la expresión de los genes específicos de cada linaje, se obtuvieron controles positivos para cada linaje de diferenciación. Se extrajo ARNm de tejido adiposo inguinal, periostio femoral y fibroblastos dérmicos de rata para el linaje adipogénico, osteogénico y fibrogénico respectivamente.

8.12. Análisis de los resultados obtenidos de la tinción

La diferenciación a osteogénesis fue confirmada a través de microscopía por la detección de depósitos minerales de fosfato inorgánico en extracelular, teñidos de color marrón oscuro (Tholpady *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2010; Zuk *et al.*, 2001). Estos resultados fueron comparados con las ADSC cultivadas en medio control para confirmar la diferenciación, visualizando la ausencia de depósitos minerales.

La diferenciación a adipogénesis fue determinada microscópicamente por la presencia de vacuolas lipídicas teñidas de color rojo (Tholpady *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2010; Zuk *et al.*, 2001). Estos resultados fueron comparados con las imágenes microscópicas de las ADSC cultivadas en medio control, visualizando la ausencia de vacuolas lipídicas y la ausencia de tinción.

La diferenciación a fibrogénesis fue detectada a través de microscopía por la presencia de fibras de colágeno teñidas de color azul en la matriz extracelular (Lee *et al.*, 2010). Para confirmar la diferenciación, estos resultados fueron comparados con las ADSC cultivadas en medio control, visualizando la ausencia de fibras teñidas en el espacio extracelular.

8.11. Análisis de los resultados densitométricos del RT-PCR

Se realizó análisis estadístico a los valores de expresión relativa obtenidos para los diferentes experimentos por separado: diferenciación osteogénica, diferenciación adipogénica, diferenciación fibrogénica y suplementación con rTcCRT.

Para semicuantificar los datos obtenidos en los geles de electroforesis, se analizó la intensidad de la banda de expresión para cada gen, mediante densitometría (*ImageJ Software*, NIH, Maryland, EE.UU.). Para obtener una expresión relativa, estos valores se normalizaron con la intensidad de banda de expresión del gen constitutivo β -ACTINA de cada tratamiento.

Los resultados se analizaron estadísticamente a través de la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico de varianza ANOVA, utilizando el software estadístico *GraphPad Prism 7.02* con un intervalo de confianza de 95%, $p < 0,05$. Adicionalmente, se realizó un post-test para comparar la diferencia entre tratamientos con el Test de múltiples comparaciones de Tukey.

9. RESULTADOS

9.1. Extracción de tejido adiposo

Como resultado de la extracción de tejido adiposo de las tres ratas Sprague-Dawley, se obtuvo aproximadamente 12 g de tejido adiposo por rata. Luego de su procesamiento con colagenasa, las células obtenidas se sembraron en botellas plásticas de cultivo de 75 cm² con medio DMEM-HG suplementado con 10% SFB, 1% de solución antibiótica y antimicótica (penicilina 10.000 U/mL, estreptomina 10.000 ug/mL, anfotericina B 35 ug/mL). Se observó la adherencia de células al plástico de las botellas a los 2-3 días de sembrado, mostrando una morfología poligonal fibroblastoide característica de las MSC y ADSC (Figura 1). Las células fueron cultivadas por varias semanas hasta lograr un 70-80% de confluencia, obteniendo viales de 6×10^5 de células posterior a la tripsinización, los cuales fueron congelados a -80° C en medio de criopreservación para su uso temprano y en nitrógeno líquido para mantención prolongada. Las células utilizadas para los experimentos de diferenciación y control fueron de tercer y cuarto pasaje.

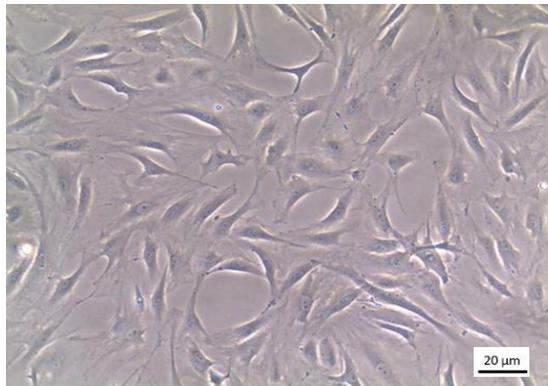


Figura 1. Morfología celular visualizada a través de microscopía invertida. Imagen visualizada con lente de aumento 100x.

9.2. Diferenciación osteogénica

Las ADSC fueron cultivadas por cuatro semanas en medio de inducción osteogénico y monitoreadas a través de microscopía invertida cada tres días. Durante este periodo, se observaron cambios morfológicos tales como prolongaciones citoplasmáticas, formación de acúmulos celulares, junto con la evidencia de depósitos de color marrón en el espacio extracelular desde los 14 y 20 días.

A los 28 días se detectó a través de tinción von Kossa la presencia de depósitos minerales correspondientes a fosfato de calcio en los cultivos de diferenciación de ADSC y detectando la ausencia de estos depósitos y su tinción en las muestras control (Figura 2A y 2B).

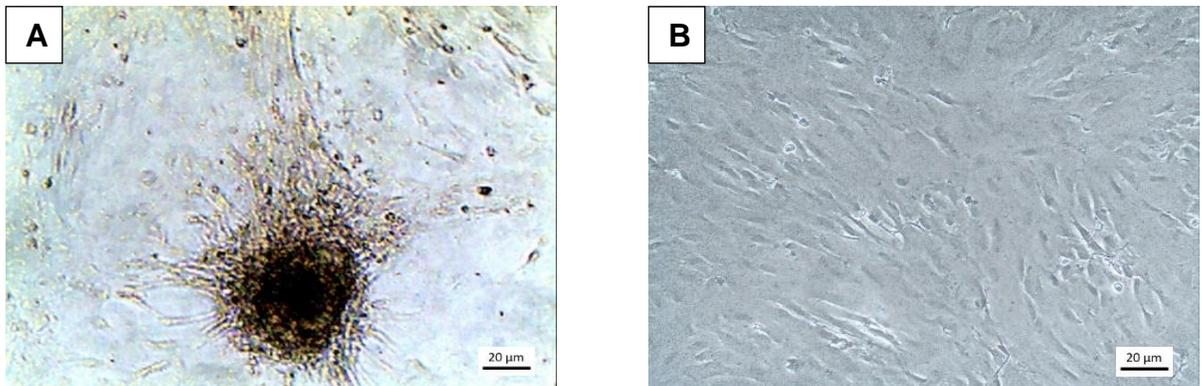


Figura 2. Tinción histoquímica específica para cada linaje de diferenciación de ADSC. (A) Tinción von Kossa en ADSC diferenciadas a linaje osteogénico (B) Tinción von Kossa en ADSC control sin diferenciar. Imágenes visualizadas con lente de aumento 100x.

La expresión del gen *OSTEONECTINA* a través de RT-PCR al día 28, resultó positiva en las ADSC experimentales diferenciadas a linaje osteogénico (Dif), observándose la presencia de una banda en el gel de electroforesis para el gen (Figura 3A). Para el caso del gen *OSTEONECTINA* en las ADSC control sin diferenciar (Neg), no se observa banda de expresión detectable en el gel de

electroforesis (Figura 3A). El control positivo, correspondiente a periostio de rata (Pos), mostró la presencia de una banda de expresión a la electroforesis (Figura 3A). La expresión relativa del gen *OSTEONECTINA* resultó significativamente mayor en las ADSC diferenciadas (Dif), en comparación a las ADSC control sin diferenciar (Neg) y al control positivo (Pos) (Figura 3B).

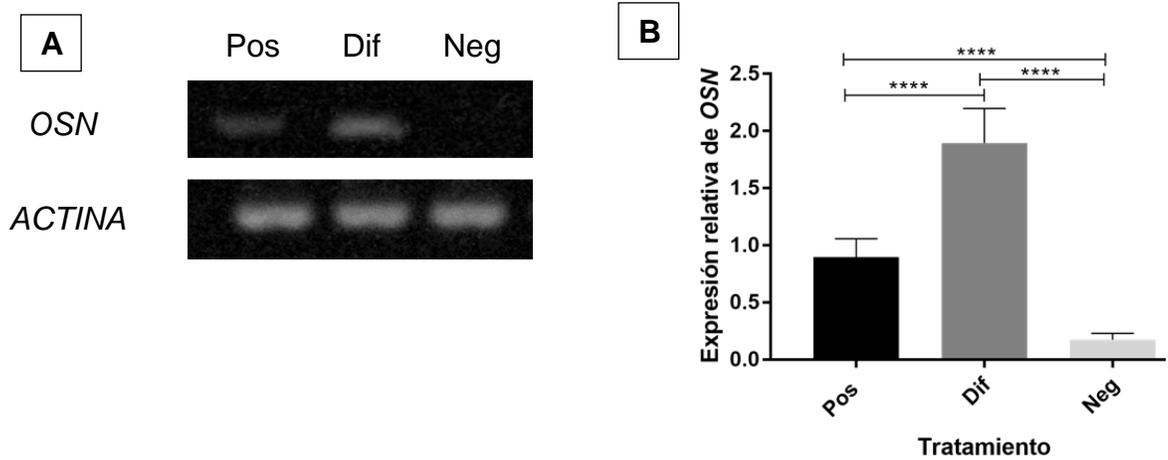


Figura 3. Electroforesis de genes específicos de linajes de diferenciación y gen constitutivo β -*ACTINA* en ADSC. (A) Gen *OSTEONECTINA* en control positivo de periostio de rata (Pos), en ADSC diferenciadas en medio osteogénico (Dif) y en ADSC control sin diferenciar (Neg). (B) Expresión relativa del gen *OSTEONECTINA* por densitometría, normalizada con β -*ACTINA*.

Los datos están representados en medias \pm DS. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0005$.

9.3. Diferenciación adipogénica

Las ADSC sometidas a diferenciación adipogénica fueron cultivadas por 28 días, observando cambios morfológicos, tales como presencia de vacuolas lipídicas intracelulares y aumento del tamaño celular. Por otro lado, no se observaron cambios morfológicos en las ADSC control.

A los 28 días de cultivo se realizó tinción Oil red O a las ADSC, observándose la tinción rojiza de las vacuolas lipídicas presentes en el citoplasma de las células diferenciadas a linaje adipogénico (Figura 4A). Mientras que las ADSC control no presentaron vacuolas intracitoplasmáticas, ni tinción (Figura 4B).

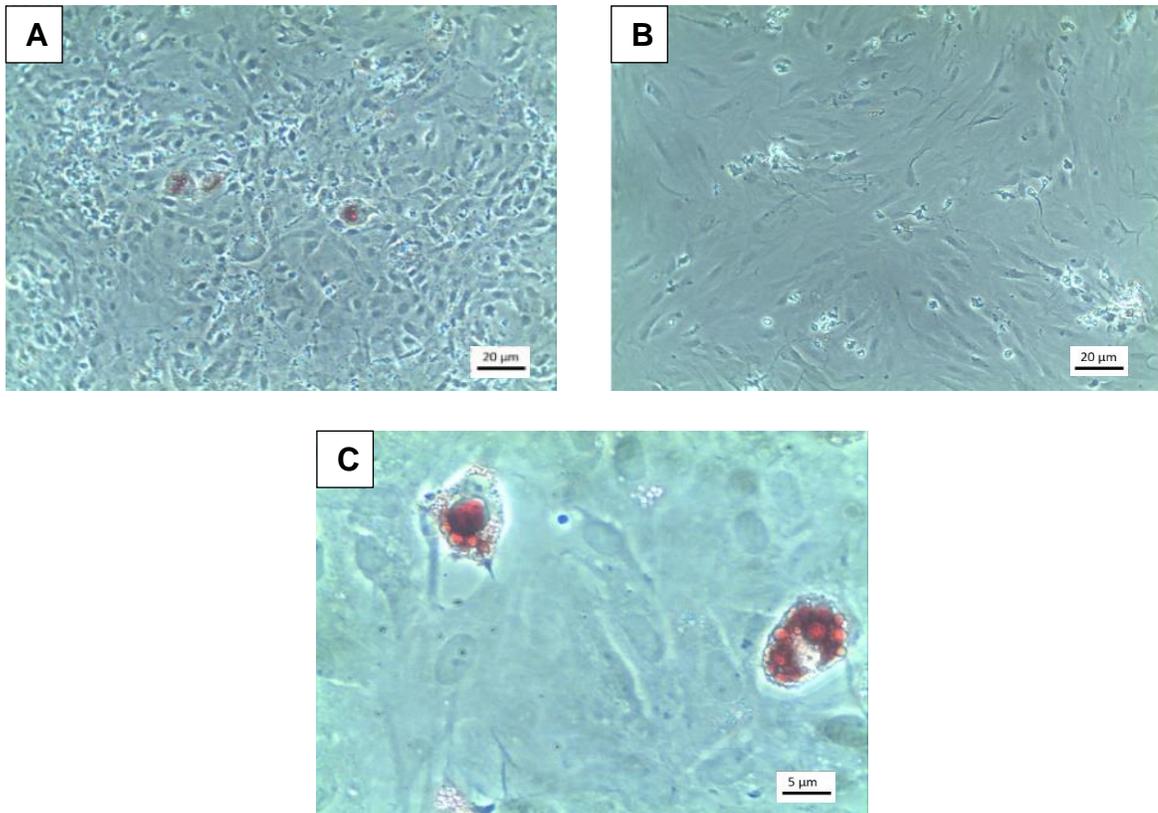


Figura 4. Tinción histoquímica específica para cada linaje de diferenciación de ADSC. (A) Tinción Oil Red O en ADSC diferenciadas a linaje adipogénico. Imagen visualizada con lente de aumento 100x. (B) Tinción Oil Red O en ADSC control sin diferenciar. Imagen visualizada con lente de aumento 100x. (C) Tinción Oil Red O en ADSC diferenciadas a linaje adipogénico en aumento. Imagen visualizada con lente de aumento 400x.

La expresión del gen *PPARγ2* fue analizada a través de RT-PCR y resultó negativa en las ADSC diferenciadas a linaje adipogénico (Pos), observándose la ausencia de banda detectable en el gel de electroforesis, al igual que en las

ADSC control sin diferenciar (Neg) (Figura 5A). El control positivo, correspondiente a tejido adiposo de rata (Pos), demostró la presencia de banda de expresión en el gel de electroforesis (Figura 5A). La expresión relativa para el gen *PPAR γ 2* resultó significativamente mayor en el control positivo (Pos), en comparación a las ADSC diferenciadas (Dif) y las ADSC control (Neg) (Figura 5B).

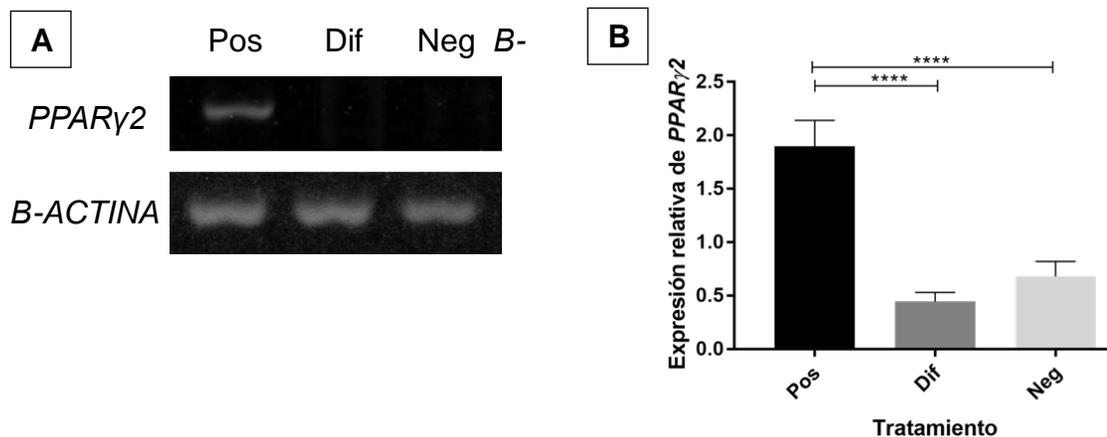


Figura 5. Electroforesis de genes específicos de linajes de diferenciación y gen constitutivo β -*ACTINA* en ADSC. (A) Gen *PPAR γ 2* en control positivo de grasa de rata (Pos), en ADSC diferenciadas en medio adipogénico (Dif) y en ADSC control sin diferenciar (Neg). (B) Expresión relativa del gen *PPAR γ 2* por densitometría, normalizada con β -*ACTINA*.

Los datos están representados en medias \pm DS. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0005$.

9.4. Diferenciación fibrogénica

El cultivo de ADSC bajo condiciones fibrogénicas demostró cambios morfológicos por parte de las células, tales como prolongaciones citoplasmáticas y presencia de fibras entre células colindantes.

Al día 28, las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico fueron teñidas con tinción tricrómica de Mallory, detectando la tinción azulada de fibras colágenas

presentes en el espacio extracelular (Figura 6A). Por otro lado, las ADSC control no presentaron tinción de fibras (Figura 6B).

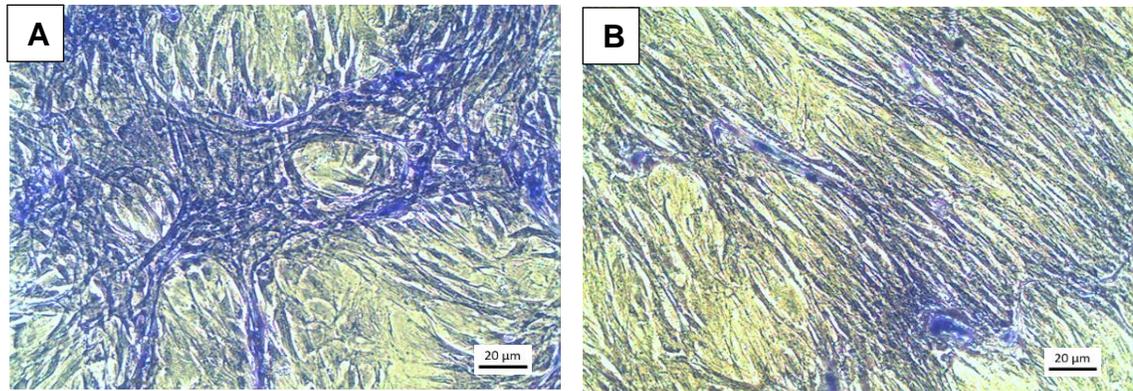


Figura 6. Tinción histoquímica específica para cada linaje de diferenciación de ADSC. (A) Tinción tricrómica de Mallory en ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico. (B) Tinción tricrómica de Mallory en ADSC control sin diferenciar. Imágenes visualizadas con lente de aumento 100x.

La expresión del gen TN-C fue analizada a través de RT-PCR demostrando la presencia de una banda en el gel de electroforesis, tanto en las ADSC sometidas a diferenciación fibrogénica (Dif), como en el control positivo correspondiente a fibroblastos dérmicos de rata (Pos) (Figura 7A). Y en las ADSC control no se evidenció banda detectable para el gen TN-C (Neg) (Figura 7A). Sin embargo, se observó una expresión relativa significativamente mayor por parte de las ADSC diferenciadas (Dif) en comparación al control positivo (Pos) y a las ADSC control sin diferenciar (Neg) (Figura 7B).

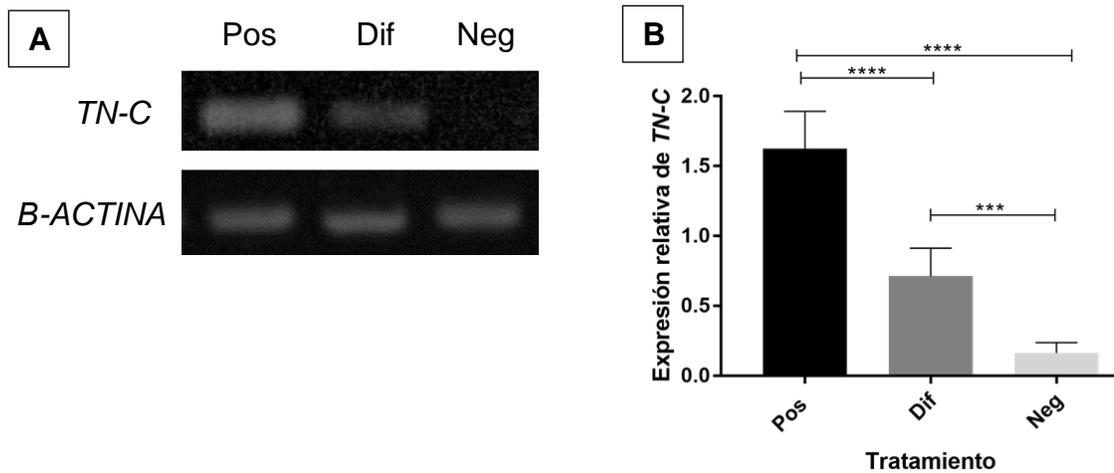


Figura 7. Electroforesis de genes específicos de linajes de diferenciación y gen constitutivo β -ACTINA en ADSC. (A) Gen *TN-C* en control positivo de fibroblastos dérmicos de rata (Pos), en ADSC diferenciadas en medio fibrogénico (Dif) y en ADSC control sin diferenciar (Neg). (B) Expresión relativa del gen *TN-C* por densitometría, normalizada con β -ACTINA.

Los datos están representados en medias \pm DS. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0005$.

9.5. Efecto de la suplementación de rTcCRT en las ADSC

Las ADSC cultivadas en medio suplementado con 10 ng/mL de rTcCRT evidenciaron cambios morfológicos tales como prolongaciones celulares y presencia de fibras en el espacio extracelular.

Al día 28, las ADSC suplementadas con rTcCRT fueron teñidas con tinción tricrómica de Mallory, detectando la tinción de fibras colágenas de color azul presentes en el espacio extracelular (Figura 8A). Las ADSC control no presentaron tinción (Figura 8B).

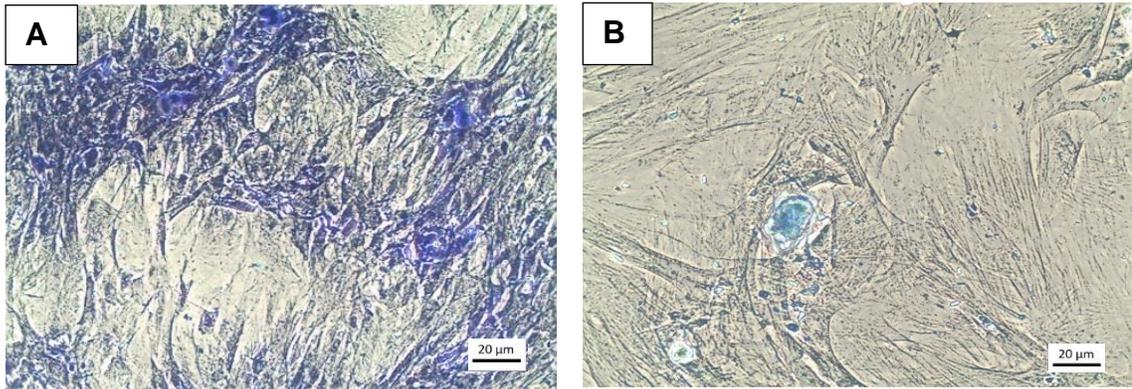


Figura 8. Tinción tricrómica de Mallory. (A) ADSC en medio de cultivo suplementado con 10 ng/mL de rTcCRT. (B) ADSC sin diferenciar en medio de cultivo control. Imágenes visualizadas con lente de aumento 100x.

La expresión de los genes *TN-C* y *MMP-1* fue analizada a través de RT-PCR detectando la expresión de estos genes tanto en las ADSC suplementadas (rTcCRT), como en el control positivo de fibroblastos dérmicos de rata (Pos). Por otro lado, las ADSC control sin diferenciar (Neg) no evidenciaron banda detectable de expresión en estos genes en el gel de electroforesis (Figura 9A y 9C). La expresión relativa para *TN-C* y *MMP-1* fue mayor en las ADSC suplementadas (rTcCRT), en comparación con las ADSC control sin diferenciar (Neg) y mayor que en las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico (Figura 9B y 9D). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la expresión relativa del control positivo (Pos) y las ADSC suplementadas con rTcCRT (rTcCRT) (Figura 9B y 9D).

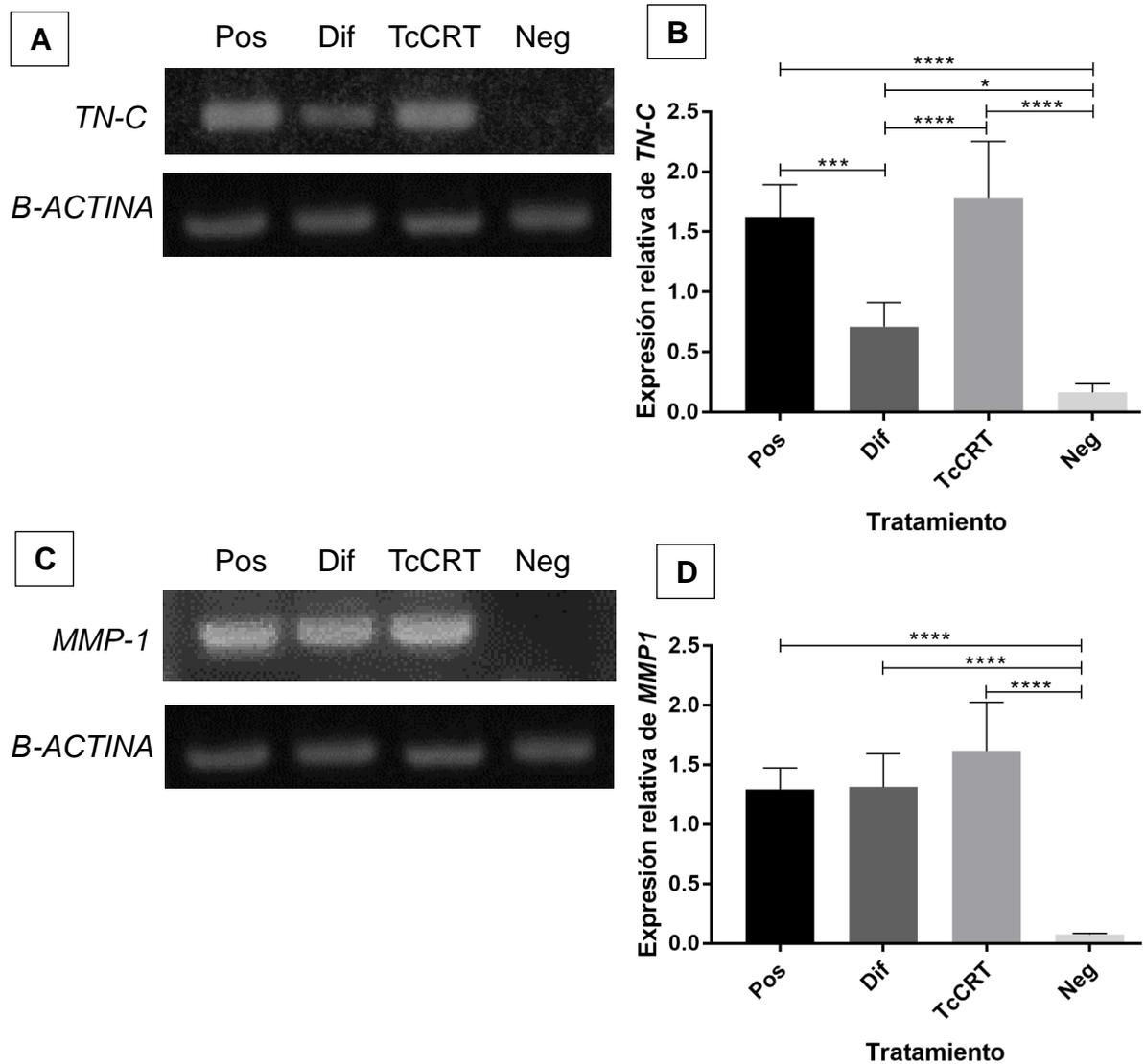


Figura 9. Electroforesis de genes específicos de linaje y gen constitutivo β -ACTINA en ADSC. (A) Gen *TN-C* en control positivo de fibroblastos dérmicos de rata (Pos), en ADSC diferenciadas en medio fibrogénico (Dif), en ADSC en medio suplementado con 10 ng/mL de rTcCRT (TcCRT) y en ADSC control sin diferenciar (Neg). (B) Expresión relativa del gen *TN-C* por densitometría, normalizada con β -ACTINA. (C) Gen *MMP-1* en control positivo de fibroblastos dérmicos de rata (Pos), en ADSC diferenciadas en medio fibrogénico (Dif), en ADSC en medio suplementado con 10 ng/mL de rTcCRT (TcCRT) y en ADSC

control sin diferenciar (Neg). (D) Expresión relativa del gen *MMP-1* por densitometría, normalizada con β -ACTINA.

Los datos están representados en medias \pm DS. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,0005$; * $p < 0,05$

10. DISCUSIÓN

Según la literatura revisada para este trabajo, existen escasos estudios que relacionen las vías o mecanismos a través de los que actúa CRT exógena en los efectos reparativos al ser aplicada de forma tópica en piel. Se ha sugerido la necesidad de comprender en profundidad los mecanismos de acción de CRT (ej. receptores, vías de señalización, estructura/función del dominio) en queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales y monocitos/macrófagos para un mejor entendimiento del papel de la CRT como una proteína de estrés y su impacto significativo en las respuestas reparativas (Nanney *et al.*, 2008). Además, se plantea la necesidad de mayor investigación básica, con el fin de identificar los dominios responsables de actividades moduladoras importantes como lo son la migración y proliferación celular en el fenómeno reparativo (Arias *et al.*, 2015).

Actualmente, solo se ha sugerido la responsabilidad por parte de la proteína TGF- β 3 en la aceleración de la cicatrización de la herida, ya que ésta se ve aumentada en la dermis de las heridas tratadas con CRT exógena, induciendo la migración celular y controlando la formación de matriz extracelular, además de inducir la entrada de macrófagos a la herida (Nanney *et al.*, 2008). Sin embargo, Nanney y colaboradores, también mencionan que la acumulación de tejido neodérmico de granulación en la restauración del tejido dérmico, es mediada en gran parte por los fibroblastos reclutados a la herida, la continua migración, proliferación y la producción de proteínas de matriz extracelular por parte de estas células; el crecimiento de capilares y la entrada de células inflamatorias y progenitores celulares desde las cercanías a la herida (Nanney *et al.*, 2008).

Considerando la literatura antes mencionada, y los pocos estudios en relación a los mecanismos de acción por parte de CRT, es que surge la propuesta de inducción de diferenciación sobre las células progenitoras de los alrededores de

la herida, por acción de la CRT aplicada exógenamente. El aumento de progenitores celulares visualizados *in vivo*, el aumento en la cantidad de fibroblastos y el aumento en su migración, sugieren el estudio más profundo del efecto que podría tener CRT sobre éstos (Nanney *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2015). Es por estos antecedentes, que relacionamos el aumento de estos progenitores celulares y fibroblastos, con las ADSC presentes en el tejido adiposo subcutáneo adyacente a una herida y sugerimos su diferenciación al tipo celular fibrogénico.

La inducción a diferenciación de las ADSC a los diferentes linajes mesodérmicos mostró variados resultados según el método de detección. En este estudio se contó con los resultados del análisis de la expresión de genes específicos de diferenciación, a través de RT-PCR y a través de la tinción de productos extracelulares e intracelulares en los cultivos en monocapa.

En el caso de la detección de diferenciación osteogénica en este estudio, la osteogénesis se confirmó a través de tinción von Kossa al día 28, en donde se observó la tinción de minerales en el extracelular de color marrón, coincidentes con los resultados obtenidos en otros estudios de diferenciación de MSC (Cortes *et al.*, 2013; Marion y Mao, 2006) y ADSC (Tholpady *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2010; Zuk *et al.*, 2001).

En el análisis de RT-PCR, las ADSC diferenciadas a linaje osteogénico expresaron niveles significativamente altos para el gen específico *OSTEONECTINA*. Comparativamente, se observó una expresión relativa mayor de ARNm en las ADSC diferenciadas a linaje osteogénico, en comparación a los niveles de expresión relativa en el control positivo de origen periostal de rata. Lo cual es esperable considerando la estructura, composición y extracción del periostio utilizado como control positivo para este gen. El periostio fue extraído a través de raspado de fémur de rata y, anatómicamente, la capa más externa del periostio es fibrosa y poco celularizada y la capa interna en contacto

directo con el hueso es osteogénica, altamente celularizada y rica es osteoblastos (Ellender *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 2004). Esto explicaría la diferencia relativa en la expresión de este gen en ambos casos experimentales. Por otro lado, los niveles relativos de expresión para el gen *OSTEONECTINA* en las ADSC control sin diferenciar, fueron significativamente bajos, en comparación a las ADSC diferenciadas a linaje osteogénico, tal como se describe en los estudios realizados para el análisis de este gen (Gimble y Guilak, 2003; Marion y Mao, 2006).

En el caso de los resultados obtenidos en relación a la detección de diferenciación a linaje adipogénico, la adipogénesis se confirmó a través de tinción Oil Red O al día 28, en donde se observó la tinción de vacuolas lipídicas intracelulares de color rojo, evidencias características del uso de esta tinción en MSC (Cortes *et al.*, 2013; Marion y Mao, 2006) y en ADSC (Tholpady *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2010; Zuk *et al.*, 2001).

Para el análisis a través de RT-PCR, las ADSC diferenciadas a linaje adipogénico no mostraron expresión detectable del ARNm para el marcador *PPAR γ 2*. Lo cual puede ser explicado al visualizar microscópicamente los resultados de tinción Oil Red O, en donde podemos observar la escasa cantidad de células con tinción positiva. Lo cual se correlaciona con la ausencia de expresión detectable al RT-PCR, que se puede explicar por la baja sensibilidad que puede tener este método en la detección de bajas concentraciones de ARNm, en comparación al método de RT-PCR cuantitativo o tiempo real (RT-qPCR) (Gál *et al.*, 2006). Sin embargo, el control positivo obtenido de tejido adiposo inguinal de rata sí demostró niveles de expresión significativa para el gen, en comparación a las ADSC diferenciadas a linaje adipogénico y a las ADSC control sin diferenciar. La expresión del gen *PPAR γ 2* en el control positivo, descarta la inespecificidad por parte de los partidores de RT-PCR utilizados y coincide con lo descrito (Bosnakovski, *et al.*, 2005; Cortes *et al.*, 2013). Por otro lado, las ADSC control sin diferenciar cultivadas durante

el mismo tiempo que las experimentales, no mostraron niveles de expresión significativos del gen adipogénico, en comparación a las ADSC diferenciadas a linaje adipogénico.

Finalmente, para la diferenciación a linaje fibrogénico, la fibrogénesis se confirmó a través de tinción histoquímica, utilizando la tinción tricrómica de Mallory, una tinción para diferenciar componentes extracelulares y que entre sus colorantes posee la anilina azul. La anilina azul es el colorante que le otorga el color azul a las fibras de colágeno, uniéndose selectivamente a esta proteína de matriz extracelular (Goldner, 1938).

El análisis de expresión de ARNm en las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico a través de RT-PCR, mostró niveles significativos para el gen *TN-C*, comparables con los niveles de expresión para el control positivo proveniente de fibroblastos dérmicos de rata. Sin embargo, como era de esperar, los niveles de expresión de ARNm para el gen *TN-C* en el control positivo fueron significativamente mayores a los experimentales. Esta diferencia puede explicarse porque el origen de estas células fue de un cultivo primario de fibroblastos dérmicos de rata cultivados *in vitro*. Además, cabe destacar que para la diferenciación fibrogénica se utilizó una concentración de 50 ng/mL de CTGF, la cual es una concentración intermedia entre 10 ng/mL y 100 ng/mL, descritas para la diferenciación fibrogénica (Lee *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2011). Por otro lado, la expresión relativa del gen *TN-C* fue significativamente mayor en las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico, en comparación al control negativo de ADSC sin diferenciar, que mostró niveles de expresión significativamente muy bajas para el gen (Lee *et al.*, 2010).

Para el análisis del efecto de CRT, las ADSC fueron tratadas con rTcCRT, al ser una proteína más eficiente que su contraparte humana en su capacidad para incrementar la proliferación y migración de fibroblastos humanos en un ensayo *scratch plate* de cicatrización de heridas (Arias *et al.*, 2015).

Adicionalmente, pensando en un uso terapéutico de esta proteína, la TcCRT sería ideal por su eficiencia a bajas concentraciones, además de su bajo costo (Arias *et al.*, 2015).

Las ADSC experimentales suplementadas con CRT fueron cultivadas con 10 ng/mL de rTcCRT (Arias *et al.*, 2015), una concentración comparativamente menor a las concentraciones de 1 mg/mL y 5 mg/mL, descritas en los primeros estudios del uso tópico de HuCRT en heridas cutáneas de porcinos (Nanney *et al.*, 2008). Obteniendo, los resultados esperados en relación al efecto diferenciador que CRT ejercería sobre las ADSC.

Las ADSC suplementadas con rTcCRT exhibieron una morfología compatible con la morfología descrita para el tipo celular fibrogénico (Lee *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2011). Por otro lado, se obtuvieron similitudes entre las tinciones con tricrómica de Mallory, en las ADSC suplementadas con rTcCRT y en las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico. Observándose la presencia de las fibras colágenas teñidas con anilina azul en el extracelular, entre las células del cultivo en monocapa (Goldner, 1938).

Finalmente, para el análisis de la expresión relativa de ARNm, se agregó el análisis de un segundo marcador específico de linaje fibrogénico; *MMP-1*. Con estos dos marcadores se obtuvieron resultados determinantes en relación a lo propuesto como hipótesis para este estudio, observándose para ambos genes, niveles de expresión significativos en comparación a las ADSC control sin diferenciar.

La expresión de ARNm para el gen *TN-C* en las ADSC suplementadas con rTcCRT mostró niveles comparables con los niveles de expresión observados en el control positivo de fibroblastos dérmicos de rata, sin diferencias significativas. Al comparar los niveles de expresión de *TN-C* de las ADSC suplementadas, estos niveles fueron significativamente mayores que en las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico. Demostrando el potente efecto

inductor por parte de rTcCRT, mayor al efecto diferenciador del factor de crecimiento utilizado (CTGF). En el caso de la expresión de ARNm para el gen *TN-C* en las ADSC control sin diferenciar, se observaron niveles de expresión significativamente bajos. Al comparar los niveles de expresión de las ADSC suplementadas, con los niveles de expresión en las ADSC control sin diferenciar, se observaron niveles significativamente mayores por parte de las células suplementadas con rTcCRT.

La expresión de ARNm para el gen *MMP-1* en las ADSC suplementadas con rTcCRT, mostró niveles significativos comparables con las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico y con el control positivo.

Al comparar los niveles de expresión de este gen fibrogénico en las ADSC suplementadas con las ADSC diferenciadas a linaje fibrogénico y con el control positivo, no se observaron diferencias significativas entre ellos. Demostrando el potente efecto inductor por parte de rTcCRT, comparable y casi igual al efecto diferenciador del factor de crecimiento utilizado (CTGF). Se observaron niveles de expresión de *MMP-1* significativamente mayores en las ADSC suplementadas en comparación con los niveles de expresión en las ADSC control sin diferenciar.

Estos resultados de expresión génica, junto con lo visualizado microscópicamente a través de la tinción tricrómica de Mallory, nos muestra que las ADSC suplementadas con rTcCRT estarían siendo inducidas por esta proteína a expresar genes propios de una célula fibroblástica y comportándose como células fibroblásticas, sintetizando colágeno (Kalluri y Zeisberg, 2006). Además, la confirmación de que no existe influencia por parte del medio de cultivo control que induzca una diferenciación de las ADSC en cultivo. Ya que no hay expresión de ninguno de los dos genes fibrogénicos evaluados en las ADSC control sin diferenciar.

11. CONCLUSIONES

Podemos concluir con los resultados obtenidos en este estudio, que TcCRT tiene un efecto diferenciador sobre las ADSC de rata, *in vitro*, equivalente al efecto diferenciador de CTGF. La suplementación con TcCRT, induce la expresión de los genes de linaje fibrogénico, *TN-C* y *MMP-1*.

Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, uno de los mecanismos involucrados en la aceleración de la reparación y el cierre de heridas de piel ejercida por la utilización terapéutica de CRT.

TcCRT sería una molécula más eficiente en la diferenciación fibrogénica para un potencial uso de esta proteína como tratamiento de muchas patologías relacionadas con la cicatrización de heridas, considerando las bajas concentraciones para lograr efectos (10 ng/mL), en comparación al tratamiento con factores de crecimiento utilizados hoy en día, como el PDGF a 100.000 ng/mL.

Los resultados y evidencias obtenidas en este estudio, contribuyen al posible inicio del desarrollo de terapias combinadas de células madre mesenquimales y CRT como factor diferenciador.

Cabe destacar, que se requiere mayor información y estudios en profundidad con respecto a CRT, tomando en cuenta los resultados aquí presentados.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.R., HOCK, J.M., BURR, D.B. 2004. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone* 35(5):1003-1012.

ARIAS, J.I., SEPÚLVEDA, C., BRAVO, P., HAMILTON-WEST, C., MALDONADO, I., FERREIRA, A. 2012. Comparative effect of human and *Trypanosoma cruzi* calreticulin in wound healing. *Journal Tissue Eng Regen Med* 9(1):41-54

BOSNAKOVSKI, D., MIZUNO, M., KIM, G., TAKAGI, S., OKUMURA, M., FUJINAGA, T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319(2): 243-253.

CAPLAN, A.I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* (5):641–650.

CAPLAN, A.I., CORREA, D. 2011. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9(1):11-15.

CORTES, Y., OJEDA, M., ARAYA, D., DUEÑAS, F., FERNÁNDEZ, M.S., PERALTA, O.A. 2013. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res.* 9:133.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-317

ELLENDER, G., FEIK, S.A., CARACH, B.J. 1988. Periosteal structure and development in a rat caudal vertebra. *J Anat.* 158:173-187.

FERREIRA, V., MOLINA, M.C., VALCK, C., ROJAS, A., AGUILAR, L., RAMÍREZ, G., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A. 2004. Role of calreticulin

from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol.* 40(17):1279-1291.

FLORES-FIGUEROA, E., MONTESINOS, J.J., MAYANI, H. 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest Clin.* 58(5):498-511

FRASER, J.K., ZHU, M., WULUR, I., ALFONSO, Z. 2008. Adipose-derived stem cells. In: Prockop, D.J., Phinney, D.G., Bunnell, B.A. (Eds.). *Methods in Molecular Biology*, vol. 449, Mesenchymal stem cells: methods and protocols. Humana Press, Totowa, NJ. EE.UU. pp. 59-67

GÁL, A.B., CARNWATH, J.W., DINNYES, A., HERRMANN, D., NIEMANN, H., WRENZYCKI, C. 2006. Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev.* 18(3):365-371.

GIMBLE, J., GUILAK, F. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 5(5):362-369.

GIMBLE, J.M., KATZ, A.J., BUNNELL, B.A. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100(9): 1249-1260.

GOLD, L.I., RAHMAN, M., BLECHMAN, K.M., GREIVES, M.R., CHURGIN, S., MICHAELS, J., CALLAGHAN, M.J., CARDWELL, N.L., POLLINS, A.C., MICHALAK, M., SIEBERT, J.W., LEVINE, J.P., GURTNER, G.C., NANNEY, L.B., GALIANO, R.D., CADACIO, C.L. 2006. Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 11(1):57-65.

GOLD, L.I., EGGLETON, P., SWEETWYNE, M.T., VAN DUYN, L.B., GREIVES, M.R., NAYLOR, S.M., MICHALAK, M., MURPHY-ULLRICH, J.E. 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* 24(3): 665-683.

GOLDMAN, R. 2004. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*. 17(1):24-35.

GOLDNER, J. 1938. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol*. 14(2): 237–243.

HAN, K. H., KANG, Y. S., HAN, S. Y., JEE, Y. H., LEE, M. H., HAN, J. Y., KIM, H. K, KIM, Y. S., CHA, D. R. 2006. Spironolactone ameliorates renal injury and connective tissue growth factor expression in type II diabetic rats. *Kidney Int*. 70(1):111-120.

HANSON, S.E., BENTZ, M.L., HEMATTI, P. 2010. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg*. 125(2):510-5166.

ISAKSON, M., DE BLACAM, C., WHELAN, D., MCARDLE, A., CLOVER, A. 2015. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int*. 831095.

ISLAM, M. S., KUSAKABE, M., HORIGUCHI, K., IINO, S., NAKAMURA, T., IWANAGA, K., HASHIMOTO, H., MATSUMOTO, S., MURATA, T., HORI, M. AND OZAKI, H. 2014. PDGF and TGF- β promote tenascin-C expression in subepithelial myofibroblasts and contribute to intestinal mucosal protection in mice. *Br J Pharmacol* 171(2): 375–388.

KALLURI, R., ZEISBERG, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6(5):392-401.

LEE, C.H., SHAH, B., MOIOLI, E.K., MAO, J.J. 2010. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin. Invest* 120(9): 3340-3349.

MARION, N.W., MAO, J.J. 2006. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol*. 420:339-361.

- MAXSON S., LOPEZ E.A., YOO, D., DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A., LEROUX, M.A.** 2012. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl. Med.*1(2):142-149.
- MENENDEZ, Y., ALVAREZ M., FERRERO, A., PEREZ, M., PEREZ, S., ESCUDERO, D., OTERO, J.** 2014. Adult Stem Cell Therapy in Chronic Wound Healing. *J Stem Cell Res Ther* 4:162.
- MICHALAK, M., GROENENDYK, J., SZABO, E., GOLD, L.I., OPAS, M.** 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417(3): 651-666.
- NANNEY, L.B., WOODRELL, C.D., GREIVES, M.R., CARDWELL, N.L., POLLINS, A.C., BANCROFT, T.A., CHESSER, A., MICHALAK, M., RAHMAN, M., SIEBERT, J.W., GOLD, L.I.** 2008. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol* 173(3): 610-630.
- OKABE, K., HAYASHI, R., ARAMAKI-HATTORI, N., SAKAMOTO, Y., KISHI, K.** 2013. Wound Treatment Using Growth Factors. *Modern Plastic Surgery.* 3(3): 108-112.
- RAMÍREZ, G., VALCK, C., FERREIRA, V.P., LÓPEZ, N., FERREIRA, A.** 2011. Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host–parasite interplay. *Trends Parasitol.* 27: 115–122.
- RAMOS, R., JURI, M., RAMOS, A., HOECKER, G., LAVANDERO, S., PENA, P., MORELLO, A., REPETTO, Y., AGUILLON, J.C., FERREIRA, A.,** 1991. An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 314–322.
- RODRÍGUEZ-PARDO, V.M.** 2005. Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación. *Univ Sci.* 10(1): 5-14

SINGER, A.J., CLARK, R.A. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341(10): 738-746.

THOLPADY, S.S., KATZ, A.J., OGLE, R.C. 2003. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation *in vitro*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272(1): 398-402.

TONG, Z., SANT, S., KHADEMHOSEINI, A., JIA, X. 2011. Controlling the fibroblastic differentiation of mesenchymal stem cells via the combination of fibrous scaffolds and connective tissue growth factor. *Tissue Eng Part A.* 17(21-22):2773-2785.

VIEIRA, N.M., BRANDALISE, V., ZUCCONI, E., SECCO, M., STRAUSS, B.E., ZATZ, M. 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 19(3): 279-289.

ZUK, P.A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J, FUTRELL, J.W., KATZ, A.J., BENHAIM, P., LORENZ, H.P., HEDRICK, M.H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng,* 7(2): 211-228.

13. ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 15 de noviembre de 2011

CERTIFICADO

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto U-Inicia titulado **“Uso de Células Madre Adultas Derivadas de Tejido Adiposo Suplementada con Calreticulina Como Posible Modulador de la Cicatrización de Heridas”**, cuyo investigador principal es el Dr. **Ignacio Arias Fernández**, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que éste satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y no contraviene la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

Dr. José Luis Arias B.
Director
Comité de Bioética Animal

Dr. Santiago Urcelay V.
Decano

