



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUACIÓN DE CALRETICULINA HUMANA VERSUS
CALRETICULINA RECOMBINANTE DE *Trypanosoma cruzi* EN LA
INDUCCIÓN DE TEJIDO FIBROSO PARA LA CICATRIZACIÓN
DE PIEL EN RATAS

CAROLL SEPÚLVEDA NÚÑEZ

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

PROFESOR GUÍA: JOSÉ IGNACIO ARIAS FERNÁNDEZ

FONDECYT 3100021
SANTIAGO, CHILE
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUACIÓN DE CALRETICULINA HUMANA VERSUS
CALRETICULINA RECOMBINANTE DE *Trypanosoma cruzi* EN LA
INDUCCIÓN DE TEJIDO FIBROSO PARA LA CICATRIZACIÓN
DE PIEL EN RATAS

CAROLL SEPÚLVEDA NÚÑEZ

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JOSÉ I. ARIAS
PROFESOR CONSEJERO: GALIA RAMÍREZ
PROFESOR CONSEJERO: ULISES VERGARA

FONDECYT 3100021
SANTIAGO, CHILE
2012

Evaluación de calreticulina humana versus calreticulina de *Trypanosoma cruzi* en la inducción de tejido fibroso para la cicatrización de piel en ratas

Evaluation of human calreticulin versus *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the induction of fibrous tissue for skin healing in rats

Caroll Estefani Sepúlveda Núñez*

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

RESUMEN

Calreticulina (CRT) es una proteína ubicua, altamente conservada, que se localiza principalmente en el retículo endoplásmico (RE), donde es elemental para el correcto plegamiento y transporte de proteínas. Se han descrito diversas funciones extracelulares para esta proteína, entre ellas, inducir la fagocitosis de células apoptóticas, y promover la migración concentración-dependiente de queratinocitos, fibroblastos, macrófagos y monocitos, estimulando la re-epitelización a través de la proliferación celular de queratinocitos y fibroblastos, procesos fundamentales para la cicatrización de heridas cutáneas. Es así como, se evaluaron diversos efectos de CRT recombinante humana (rHuCRT) y parasitaria proveniente del protozoo *Trypanosoma cruzi* (rTcCRT) administrada subcutáneamente en distintas concentraciones, en el proceso de cicatrización de heridas en la piel de ratas. Se comparó la efectividad de ambas proteínas en el porcentaje de re-epitelización, proliferación celular (medido como N° de células/cm²) y profundidad dérmica, tanto a los 5 como 10 días post-intervención. Los mejores resultados en la cicatrización de heridas de piel en ratas fueron obtenidos al administrar rTcCRT en menor concentración (2.500 veces menos concentrada que la dosis alta) y rHuCRT a mayor concentración.

PALABRAS CLAVES: Calreticulina, cicatrización de heridas, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Calreticulin (CRT) is a ubiquitous protein highly conserved mainly localized in the endoplasmic reticulum (ER), which is elementary for the proper folding and protein transport. Have been described various extracellular functions for this protein, including induction of phagocytosis of apoptotic cells and promote migration concentration-dependent keratinocytes, fibroblasts, macrophages and monocytes, stimulate re-epithelialization through cell proliferation of keratinocytes and fibroblasts, processes essential for cutaneous wound healing. Thus, we evaluated various effects of recombinant human (rHuCRT) and protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (rTcCRT) CRT administered subcutaneously at different concentrations, in the process of wound healing in the skin of rat. We compared effectiveness of both proteins in the percentage of re-epithelialization, cell proliferation (measured as numbers of cells), and dermal depth, both at 5 and 10 days post-intervention. The best results in healing of skin wounds in rats were obtained by administering rTcCRT in lower concentrations (2,500 times less concentrated than the high dose) and rHuCRT of higher concentration.

KEY WORDS: Calreticulin, wound healing, *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de la integridad de la piel debido a una lesión o enfermedad aguda puede dar lugar a un desequilibrio fisiológico importante ya que muchas veces debido a desequilibrios metabólicos en el proceso cicatricial de la piel, las heridas se presentan de forma crónica (Clark et al., 2007). En nuestro país las principales causas en la presentación de este tipo de heridas son la diabetes mellitus (cuya prevalencia es 9,4% (MINSAL, 2011)), y la insuficiencia vascular venosa. Del total de estas heridas, 40.000 corresponden a pacientes con úlceras venosas y 12.000 a pacientes con úlceras de pie diabético al año (Piel artificial, UACH, 2010).

Se estima que en tratamientos al año, se gastan más de \$70 mil millones en los pacientes con úlceras venosas y \$9 mil millones en amputaciones menores en pacientes con úlceras diabéticas, estos valores no incluyen las pérdidas pecuniarias que afectarán al paciente y al Estado, a este último por el lucro cesante, ni el costo de una segunda amputación y el daño económico y social de la muerte del 50% de los pacientes que han sufrido una amputación (Piel artificial, UACH, 2010).

El objetivo ideal de la cicatrización de las heridas es la recuperación de los tejidos de manera que la estructura y las propiedades funcionales puedan ser restablecidas. Los tratamientos tradicionales, suelen basarse en simples pautas de cuidado, como desbridamiento, limpieza y la aplicación de apósitos húmedos. Apósitos más avanzados, con factor de crecimiento en geles tópicos han tenido un éxito clínico limitado, debido a la inadecuada distribución y persistencia de este factor en la zona de la herida (Stefonek and Master, 2007). Por lo tanto la adición de algún factor que promueva la migración de diversos tipos celulares involucrados en el proceso cicatricial hacia el sitio de la herida, podría mejorar la formación de tejido granular.

Encontrada originalmente en células musculares de conejo, calreticulina (CRT) (Ostwald and MacLennan, 1974), es una glicoproteína de 46 kDa conformada por tres dominios (C, N y P) (Gold *et al.*, 2006). Esta proteína es altamente conservada y pleiotrópica, distribuida ampliamente en las células eucariotas, al interior del retículo endoplásmico (RE), asegurando el correcto plegamiento y transporte de proteínas y glicoproteínas. Además, actúa en la regulación del metabolismo de calcio e interviene en la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la adhesión celular (Nanney *et al.*, 2008; Villagomez *et al.*, 2009; Michalak *et al.*, 2009; Gold *et al.*, 2010). Sin embargo, durante los últimos 20 años, ha sido descrita no sólo al interior del RE, sino que en la superficie celular, el citoplasma y el núcleo (Michalak *et al.*, 2009), Actualmente, se le atribuyen variadas y novedosas funciones extracelulares, dentro de las que se destacan sus propiedades antitumorales (Pike *et al.*, 1998; Obeid *et al.*, 2007; Michalak *et*

al., 2009; López *et al.*, 2010), anti-angiogénicas (Pike *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2005; López *et al.*, 2010), reguladora de la respuesta inmune (Aguilar *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2005; Obeid *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2011), desarrollo embrionario (Michalak *et al.*, 2009), promoción de la adhesión celular (Papp *et al.*, 2007) y la cicatrización de heridas cutáneas (Gold *et al.*, 2006 y 2010; Nanney *et al.*, 2008), entre otras.

Algunos estudios han demostrado que la CRT promueve el proceso de reparación de heridas en la piel (Nguyen *et al.*, 2009), actuando tanto a nivel dérmico como epidérmico, a través de diferentes mecanismos (Gold *et al.*, 2006; Nanney *et al.*, 2008). Originalmente, CRT fue identificada como el componente biológicamente activo del ácido hialurónico, aislado en piel de fetos de ovejas. Este polisacárido acelera la cicatrización de heridas en modelos animales experimentales de regeneración cutánea (Burd *et al.*, 1991; Bakshandeh *et al.*, 1992; Cabrera *et al.*, 1995).

Estudios *in vivo* han demostrado que su aplicación tópica produce una mayor tasa de epitelización (efecto dosis-dependiente) (Michalak *et al.*, 2009; Gold *et al.*, 2010), a través de la migración de queratinocitos y fibroblastos hacia el sitio de la lesión, generando una fuerte inducción del tejido de granulación en modelos animales porcinos y murinos (Gold *et al.*, 2010).

Las heridas tratadas con CRT muestran un aumento en la tasa de re-epitelización y un mayor grado de estratificación de la capa epidérmica y del tejido de granulación, alcanzando una temprana madurez en comparación con las heridas tratadas con factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Nanney *et al.*, 2008). Estos efectos positivos, también se evidencian en un marcado incremento del factor de crecimiento tisular, TGF- β 3 (Nanney *et al.*, 2008). Este factor es importante en la promoción de la matriz celular, inducción de la migración celular y atracción de macrófagos hacia la herida (Barrientos *et al.*, 2008; Gold *et al.*, 2010), mientras que el efecto de CRT en la neodermis (tejido de granulación en la re-epitelización casi finalizada) de las heridas tratadas, incrementa de manera importante la proliferación de queratinocitos basales y células propias de la neodermis (Nanney *et al.*, 2008).

Otro estudio *in vitro* determinó que CRT estimula la migración de monocitos y líneas celulares de macrófagos, produciendo un aumento de macrófagos tisulares en las heridas porcinas tratadas con CRT (Gold *et al.*, 2006; Nanney *et al.*, 2008). Además, CRT desempeña un papel esencial como acompañante de integrinas y en la expresión de éstas, permitiendo la migración celular dentro de la herida (Gold *et al.*, 2010; Ihara *et al.*, 2011).

Los estudios antes mencionados exploran los efectos de CRT de mamíferos, sin embargo, esta proteína también está presente en el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Aguillón *et al.*, 2000), responsable de la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909). A diferencia de otros tripanosomátidos, como *Leishmania* y *Trypanosoma brucei*, el ciclo de vida de *T. cruzi* posee fases extracelulares e intracelulares. Su condición de parásito intracelular se relaciona con su menor susceptibilidad a las drogas anti-chagásicas y la respuesta inmune humoral (Ferreira *et al.*, 2004).

CRT de *T. cruzi* (TcCRT) está implicada en la modulación inmune y no inmune de la progresión crónica de esta enfermedad (Ramírez *et al.*, 2011), interviniendo en diversas funciones de la interacción hospedero-parásito. (Ferreira *et al.*, 2004; López *et al.*, 2010; Valck *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2011). Esta proteína se ha encontrado al interior del RE, en la superficie y fuera del parásito (Ferreira *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2011).

Diversos estudios sobre TcCRT, han mostrado que varias de las características funcionales descritas para esta proteína, se conservan en diferentes grados en CRTs proveniente de vertebrados (Ramírez, *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2005), por lo que múltiples funciones de esta molécula son operativas en una variedad CRTs de diversos orígenes. Es así, como la molécula TcCRT recombinante (rTcCRT) es idéntica aproximadamente en un 50% a su contraparte humana (HuCRT) (Ferreira *et al.*, 2004; 2005). Además, rTcCRT posee funciones extracelulares como la inhibición de la angiogénesis (Ferreira *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2011). Sin embargo, se han observado diferencias entre rHuCRT y rTcCRT (Toledo *et al.*, 2010), siendo rTcCRT más eficiente en términos equimolares que su contraparte humana, en su efecto antiangiogénico y antitumoral (López *et al.*, 2010).

Es así como el objetivo de esta memoria de título es explorar si esta diferencia en eficiencia equimolar es también pesquisable en la modulación de la cicatrización de heridas de piel. Para esto, realizamos un estudio comparativo entre rHuCRT y rTcCRT, determinando su capacidad *in vivo* de promover la cicatrización de heridas en la piel de ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Calreticulinas recombinantes

rTcCRT y rHuCRT fueron producidas y donadas por el Doctor Arturo Ferreira, Profesor del Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

II. Preparación de esponja de quitosano con glutaraldehído

Para la preparación de las esponjas se utilizó una solución de quitosano de bajo peso molecular al 2% (20-200 cps, Aldrich), desacetilado (86%), en ácido acético (5%), finalmente glutaraldehído (0,1%), el que actúa como factor entrecruzante. Fue mantenido por 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente filtrado para eliminar la solución no disuelta de quitosano e impurezas (Fernández *et al.*, 2011). La esponja de quitosano se obtuvo de la congelación de la solución en nitrógeno líquido para luego ser liofilizada durante 48 horas. Luego éstas fueron cortadas en piezas de 4 mm², envasadas individualmente para posteriormente ser esterilizadas mediante óxido de etileno.

III. Pruebas de hidratación y de estabilidad de esponjas de quitosano.

Se midió la capacidad de absorción de líquidos de la esponja de quitosano con glutaraldehído como factor entrecruzante, a través de la incubación de las esponjas con glutaraldehído entre 0 a 5% en fluido corporal simulado (SBF), pH 7,4 a 37° C. Un peso conocido de la esponja fue determinado como la media. El peso de la esponja hidratada se midió a las 12, 24, 48 y 96 horas de iniciada la prueba, se eliminó el exceso de líquido en la superficie con papel filtro, para posteriormente ser pesadas inmediatamente en una balanza electrónica. Cada experimento fue repetido tres veces y el valor medio fue obtenido como porcentaje de absorción de SBF de las esponjas de quitosano, calculado en relación a su media por la siguiente fórmula (Fig. 1):

Figura 1. Porcentaje de absorción de fluido corporal simulado de la esponja en equilibrio (E_{SBFe}). P_e es el peso de la esponja en equilibrio de absorción de SBF y P_0 es el peso inicial de la esponja.

IV. Morfología de las esponjas de quitosano al microscopio electrónico de barrido (MEB)

La morfología de la esponja de quitosano fue estudiada a través de MEB (SEM, TESLA BS 343A). Las muestras fueron recubiertas con una capa de oro 20 nm de espesor, utilizando un sistema automatizado de pulverización catódica EMS-550, a 25 mA durante cuatro minutos. Fueron examinados en su morfología superficial, tamaño de poro y estructura bajo microscopio electrónico de barrido a 15 kV.

V. Esponja de quitosano cargada con HuCRT y TcCRT

Las esponjas fueron empleadas para generar la liberación controlada de CRT en el tejido subcutáneo, las cuales fueron usadas de forma única y cargadas con 40 μ l de rHuCRT o rTcCRT de alta (1,0 μ g/ μ l) y baja (2,5 ng/ μ l) concentración (Fig. 2).

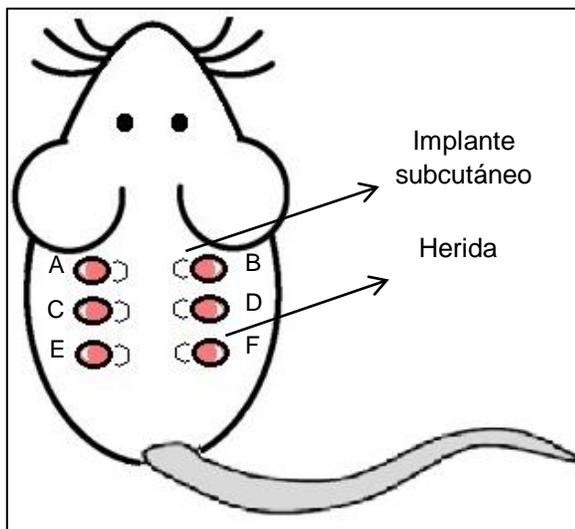


Figura 2. Distribución de heridas en rata experimental. Fueron realizadas seis heridas completas, de 5 mm de espesor, en el tórax dorsal (tres a cada lado) de cada rata. Las heridas fueron distribuidas de la siguiente manera: **A:** Implante de Quitosano (Q) + TcCRT (1 μ g/ μ l); **B:** Q + HuCRT (1 μ g/ μ l); **C:** Implante de quitosano; **D:** Herida sin implante; **E:** Q + TcCRT (2,5 ng/ μ l); **F:** Q + TcCRT (2,5 ng/ μ l).

VI. Ensayo *in vivo* de herida de piel en modelo de rata

Ratas Sprague-Dawley de sexo masculino de 300 a 350 g, fueron divididos en dos grupos experimentales (con 3 ratas por grupo). Las ratas fueron anestesiadas de forma inhalatoria con isoflurano al 2%. La piel dorsal fue rasurada, lavada con clorhexidina al 0,05% y desinfectada con una solución de alcohol al 75% (Fig. 3a). Se realizaron 6 heridas de piel en el tórax dorsal (3 en cada lado), por medio de un punch biopsial escisional de 5 mm de diámetro, luego se llevó a cabo una pequeña disección roma subcutánea y lateral a las heridas realizadas en la piel (Fig. 3b), proporcionando de esta manera un lecho para los implantes de quitosano en el subcutáneo adyacente.

Se protegieron las heridas del medio externo con una gasa estéril, sujeta a la piel (Fig. 3c) a través de seis puntos discontinuos (nylon 4-0), los que fueron retirados 24 horas post-intervención, para así evaluar la evolución del proceso cicatricial.

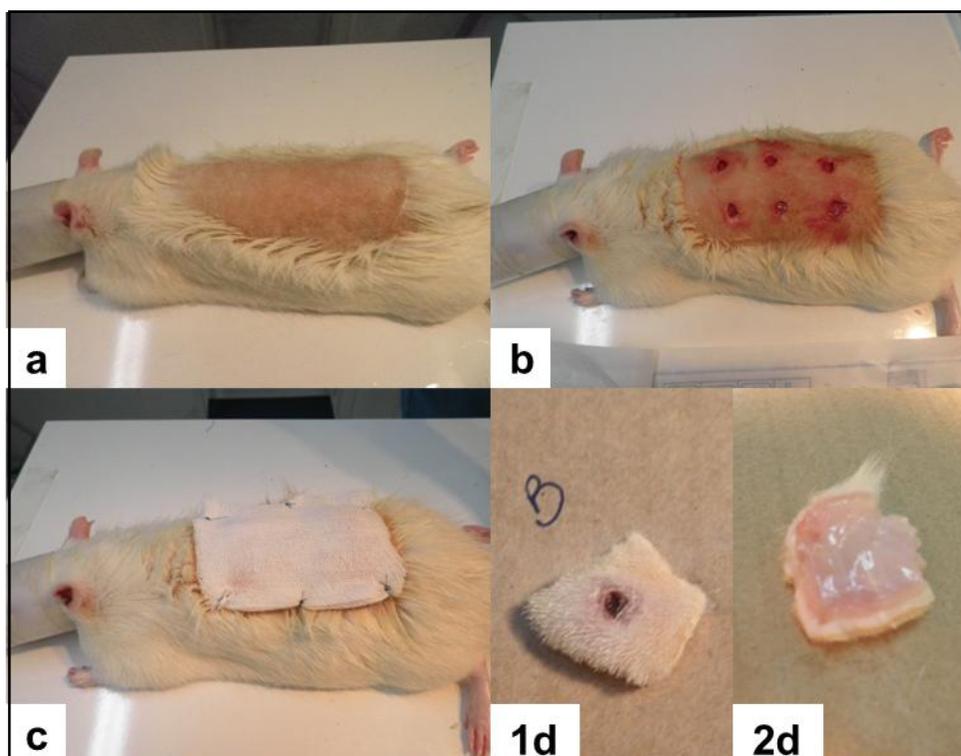


Figura 3. (a) Procedimientos pre-quirúrgicos, anestesia inhalatoria, limpieza y depilación de piel dorsal. (b) Vista dorsal de heridas de piel. (c) Protección de las heridas del medio externo con gaza estéril, sujeta a la piel a través de puntos. (1d) Remoción de heridas con tejido circundante, vista dorsal. (2d) Vista ventral.

Estas heridas cicatrizaron por segunda intención por 5 y 10 días. Al final de cada tiempo experimental, se removieron las heridas con su respectivo tejido circundante, divididos verticalmente en tres secciones que comprendían todo el espesor del tejido (Fig. 3.1d) Estos fueron fijados en un buffer neutro de formalina al 10% durante 24 horas, incluidos en parafina, cortados en laminas de 5,0 μm de espesor y montados en portaobjetos de vidrio para su análisis histológico de rutina con tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E).

Todos los protocolos de estudios en ratas (*vide infra*) fueron aprobados por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que está en conformidad con los Principios de Guía Internacionales para la Investigación Biomédica en animales elaborado por el Consejo para Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS).

VII. Análisis histológicos

Los análisis fueron realizados mediante equipo Nikon modelo Eclipse E-400 y digitalizados mediante cámara Nikon Modelo DS-SMC. Las mediciones cuantitativas se realizaron utilizando el software Nikon Image System Elements Basic Research v3.2.

i. Formación de tejido de granulación/profundidad neodermis

Se midió el espesor del tejido de granulación en portaobjetos teñidos con H&E. El tejido de granulación se define como neodermis cuando la re-epitelización estaba casi finalizada, constituyendo así, la profundidad dérmica. Las mediciones de la profundidad neodérmica se extienden desde la unión dérmica-epidérmica hasta la intersección del tejido de granulación recién formado con la musculatura discontinua del músculo panicular. Los resultados se expresaron en μm y fueron comparados con la profundidad de la dermis normal ($1,5 \pm 0,62$ mm).

ii. Densidad celular en la dermis

La dermis está conformada principalmente de tejido conectivo denso (Fig. 4 (TC)), que contiene fibras de colágeno y elastina, y menos proporción de fibroblastos, macrófagos y adipocitos, así como inervación, glándulas y folículos pilosos. Mediante imágenes digitalizadas se determinó el número de células utilizando los núcleos celulares presentes entre las fibras de colágeno del tejido conectivo de la dermis del sitio de la herida y la densidad, la cual fue expresada como el número de células/ mm^2 (Fig. 4). Los datos se compararon con el promedio de núcleos presentes en la dermis normal de ratas ($0,9$ células/ mm^2).

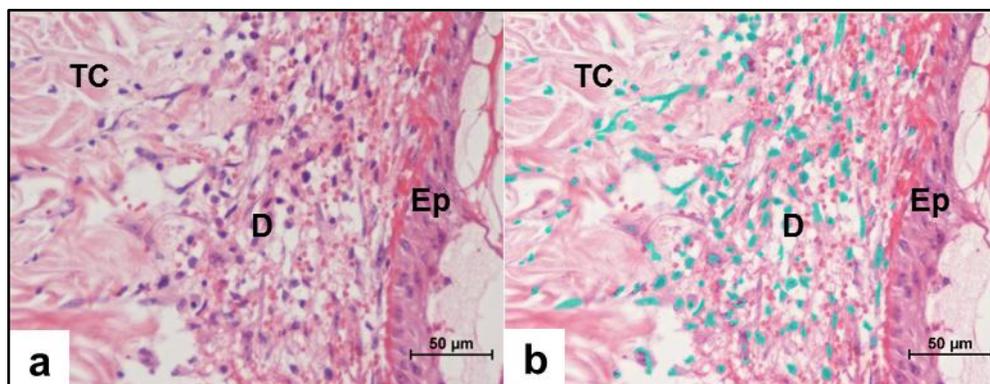


Figura 4. Determinación de la densidad celular dermal (células/ mm^2). (a) Microfotografía de piel de rata, corte transversal. Se observa la epidermis (Ep), dermis (D) y tejido conectivo (TC). (b) Núcleos celulares (color celeste) coloreados y contabilizados digitalmente (Software Nikon Image System Elements Basic Research) H&E 100x

iii. Proceso de re-epitelización

El grado de re-epitelización y la altura del epitelio escamoso estratificado en tejidos teñidos con H&E provenientes de la herida de piel en ratas fueron determinadas por medio de análisis morfométricos.

La extensión de la re-epitelización de las heridas se determinó después de 5 y 10 días de transcurrida la lesión inicial, mediante la medición de una imagen compuesta que abarcó la epidermis restituida recientemente, por la migración de células del borde epidérmico de la herida y de las islas epiteliales derivadas de la migración ascendente de células provenientes de los folículos pilosos, los que fueron comparados, con la longitud de la herida total. Los datos se expresaron como porcentaje de epitelización mediante el método descrito por Okwueze *et al.*, 2007.

VIII. Análisis estadístico

Para los ensayos de profundidad neodérmica, densidad celular y re-epitelización que fueron realizados a través de análisis morfométricos, los valores obtenidos fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilks de normalidad, posteriormente a la prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas y la prueba de Mann-Whitney para la comparación entre las muestras individuales. Los análisis estadísticos de todos los experimentos se realizaron con el software SPSS versión 12 (Chicago, IL).

RESULTADOS

I. Capacidad de absorción SBF de las esponjas de quitosano.

La capacidad de absorción de SBF se observa en el gráfico (1). El aumento de las concentraciones de glutaraldehído como agente entrecruzante, determina un menor grado de absorción de fluido corporal simulado. Fue elegido el grado de entrecruzamiento logrado con un 0,5% de glutaraldehído ya que permitía absorber un volumen de 40 μ l de la solución de CRT por cada 20 μ g de cubo de esponja de quitosano.

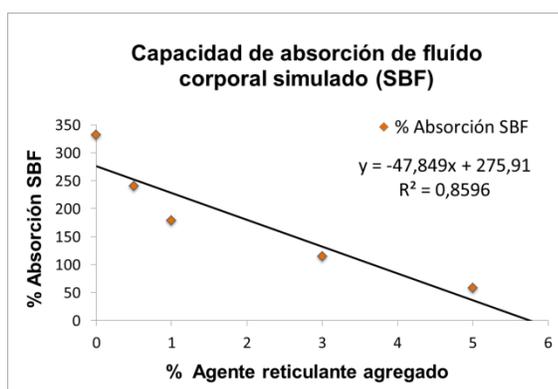


Gráfico 1. Determinación del grado de entrecruzamiento de glutaraldehído y la captación de SBF por la matriz de quitosano.

II. Morfología de la esponja

Esta imagen SEM (Fig. 5) muestra la arquitectura altamente porosa de la esponja entrecruzada con múltiples orificios e interconexiones por poros de 30-200 μm de diámetro y delimitados por delgados tabiques transversales.

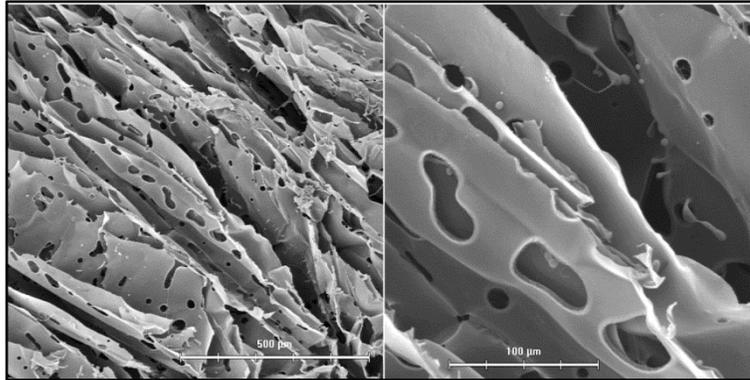


Figura 5. Morfología de la esponja de quitosano. Visto bajo microscopio electrónico de barrido.

III. Cambios morfológicos en la cicatrización de heridas de piel por el uso de CRT subcutánea.

La piel dorsal de la rata está formada por el músculo subcutáneo panículo, un músculo tipo estriado, el corion o dermis (tejido conectivo) y la epidermis (epitelio). Los apéndices epiteliales son en su mayoría folículos pilosos y glándulas sebáceas. Contrariamente a la piel humana, las glándulas sudoríparas no se observan en las ratas. La epidermis normal en el dorso de la rata está formada por cuatro o cinco capas de células: basal, espinosa, granular y córnea. Histológicamente la dermis es una capa gruesa de tejido conectivo compuesto principalmente de fibras de colágeno, con una población reducida de células incluyendo los adipocitos. En su unión con la epidermis, la dermis cutánea forma las papilas (Komesu *et al.*, 2004) (Fig. 6).

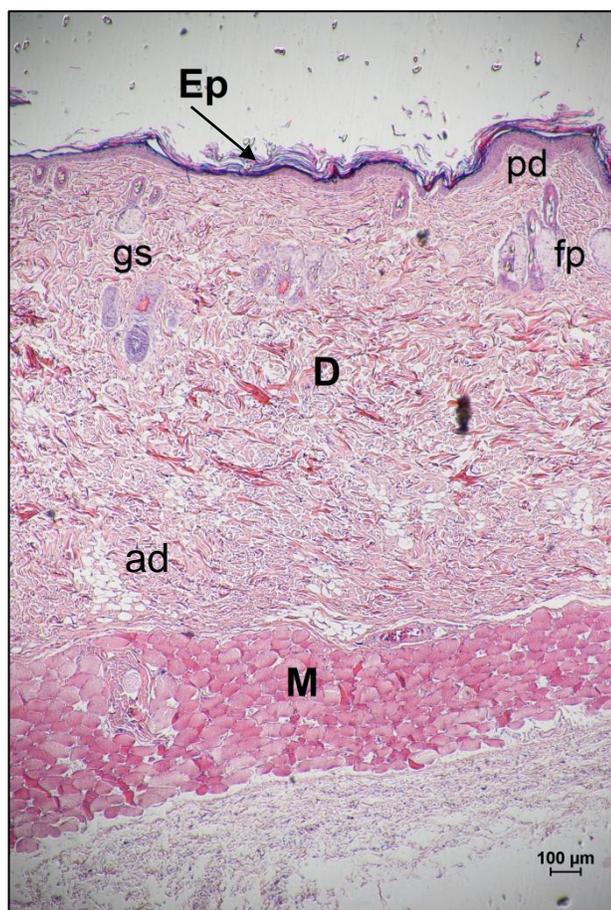


Figura 6. Microfotografía de piel dorsal normal de rata, sección transversal. Se puede observar la epidermis (**Ep**), dermis (**D**) con folículos pilosos (**fp**), glándulas sebáceas (**gs**), papila dérmica (**pd**), células adiposas (**ad**) y músculo panículo (**M**). H&E, 40x

Las heridas realizadas por escisión completa de piel del dorso de las ratas, se dejaron cicatrizar por segunda intención. Después de 5 días de cicatrización en las heridas control negativo o en aquellas en las que se implantó la esponja de quitosano subcutáneamente, se observó que aún existía una discontinuidad del músculo subcutáneo panículo, con tejido de granulación vascularizado que llena el espacio de escisión (Fig. 5a (**cs**)). También hubo una demarcación lineal bajo la costra residual de fibrina con restos necróticos en la superficie de la herida y un engrosamiento de la epidermis en sus bordes de corte, que además incluye, un proceso de re-epitelización incompleto (Fig. 7a y c).

A los 10 días de cicatrización en las heridas control negativo y las heridas implantadas sólo con quitosano, se evidenció una unión parcial del músculo panicular extirpado. La dermis se caracterizó por una estructura de mayor madurez con fibras colágenas entrecruzadas, con menor número de vasos sanguíneos y la presencia de adipocitos. Además, se pudo observar un

acabado casi por completo del proceso de re-epitelización, pero sin folículos pilosos, glándulas sebáceas, ni papilas dérmicas (Fig. 7b y d).

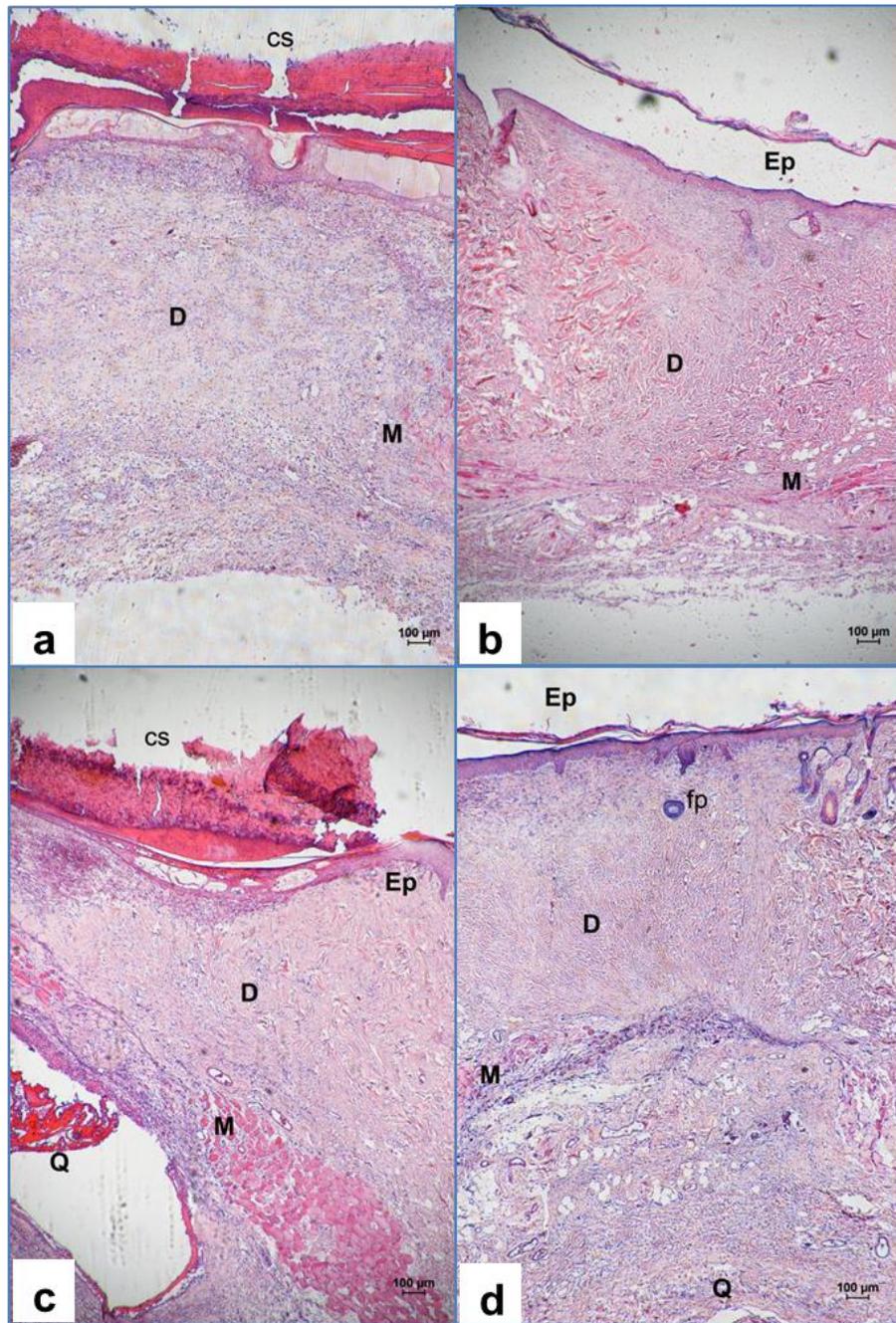


Figura 7. Microfotografías de las heridas de piel de rata teñidas con H&E después de 5 días (izquierda) y 10 días (derecha). Imágenes de herida control negativo (a) y herida implantada con quitosano libre de CRT (c). En ambos tratamientos (a, c), se puede observar costras de sangre residual (cs), re-epitelización parcial (Ep) y tejido de granulación que llena el espacio de escisión (D). A los 10 días se observan, en las heridas control negativo (b) como en las implantadas con quitosano (Q) libre de CRT (d), un mayor grado de madurez en la neodermis (D) y una casi completa re-epitelización (Ep). (M): musculo panicular; (fp): folículos pilosos. 40x.

Por otra parte, la administración de CRT promovió el proceso de cicatricial de las heridas. Luego de 5 días de cicatrización, se observó que las heridas tratadas con bajas concentraciones de rTcCRT presentaron una discontinuidad del músculo subcutáneo panicular. Además, se evidenció una dermis casi madura con fibras colágenas entrecruzadas y un término parcial del proceso de re-epitelización, aunque todavía presentaba costras de fibrina en la superficie de la herida (Fig. 8a). Mientras que después de 10 días de tratamiento con bajas concentraciones de rTcCRT, se observó una unión incipiente del músculo panicular extirpado, una dermis casi madura con fibras colágenas entrecruzadas y un completo término del proceso de re-epitelización que incluye la presencia de papilas dérmicas desarrolladas (Fig. 8b).

Al comparar rTcCRT en bajas y altas concentraciones después de 5 días post-cirugía, se observaron los mismos cambios morfológicos, incluyendo una completa finalización del proceso de re-epitelización, junto con la presencia de abundantes folículos pilosos y glándulas sebáceas, sin costras de fibrina en la superficie de la herida (Fig. 8c).

En cuanto a la cicatrización después de 10 días y en presencia de altas concentraciones de rTcCRT, se observó una unión parcial del músculo panicular extirpado, una dermis con mayor maduración, debido a la presencia de fibras colágenas entrecruzadas, menor celularidad y vasos sanguíneos. Además, las heridas presentaron abundantes adipocitos y un completo término del proceso de re-epitelización con un aumento del número de capas de células epiteliales e hiperqueratosis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y papilas dérmicas (Fig. 8d).

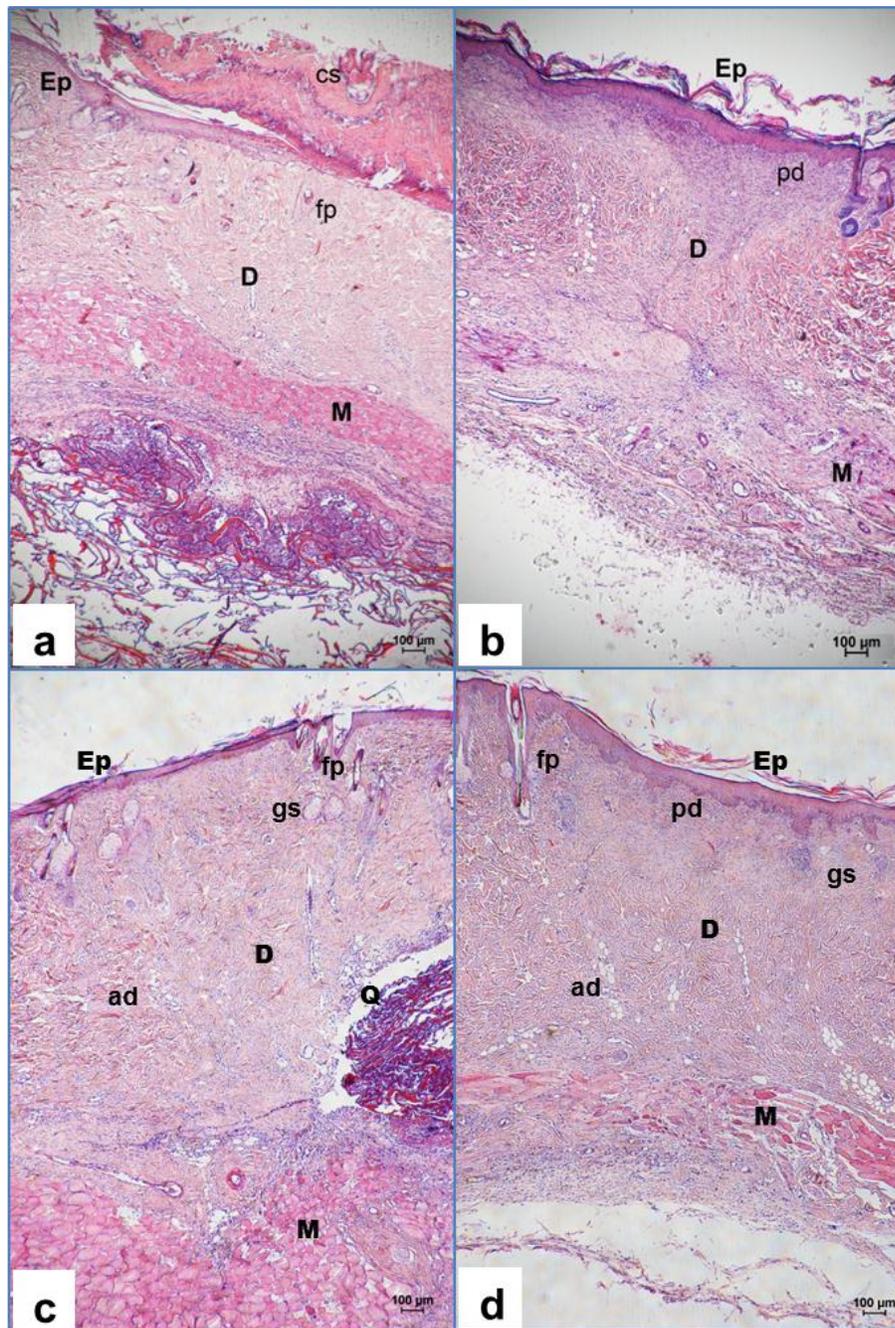


Figura 8. rTcCRT promueve la formación de neodermis y epitelización. Microfotografías de las heridas de piel de rata teñidas con H&E después de 5 días (izquierda) y 10 días (derecha). Se observan las heridas implantadas con quitosano cargado con bajas (**a, b**) o altas (**c, d**) concentraciones de rTcCRT. A los 5 días, el tratamiento de bajas concentraciones (**a**) presentó una neodermis casi madura y un proceso de epitelización parcial. Esto se observa también con concentraciones altas (**c**), pero con una completa re-epitelización. A los 10 días, a baja concentración (**b**) se indujo a una incipiente unión del músculo panicular (**M**), una neodermis casi madura (**D**) con papilas dérmicas (**pd**) y re-epitelización de la epidermis (**Ep**). Las concentraciones altas muestra a los 10 días (**d**) una unión parcial de la musculatura, neodermis madura, con adipocitos (**ad**), folículos pilosos (**fp**), glándulas sebáceas (**gs**) y papilas dérmicas (**pd**). 40x.

Por otro lado, luego de 5 días de aplicación de rHuCRT a concentraciones bajas, se observó una discontinuidad del músculo subcutáneo panicular, tejido de granulación escaso (no llena el espacio de la herida), y una costra de fibrina con restos necróticos en el superficie de la herida, sin signos de re-epitelización aparente (Fig. 9a).

Mientras que a los 10 días de tratamiento con baja concentración de rHuCRT, se observó una discontinuidad del músculo subcutáneo panicular, dermis inmadura vascularizada y una costra residual sobre un incipiente proceso de re-epitelización (Fig. 9b).

Aunque, 5 días después del uso de rHuCRT a altas concentraciones, también se evidenció la discontinuidad del músculo subcutáneo panicular. Además, se observó una dermis madura con fibras colágenas entrecruzadas, menos celularidad y vasos sanguíneos que las heridas tratadas con bajas concentraciones de rHuCRT, junto con un completo término del proceso de re-epitelización, que incluye la presencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas. Adicionalmente no se evidenciaron costras en la superficie de la herida (Fig. 9c).

En cuanto a los 10 días de tratamiento con rHuCRT a altas concentraciones, se observó una completa regeneración de la piel, en donde se evidenció una remodelación del músculo panicular recuperado, maduración de la dermis y la completa re-epitelización de la epidermis, además de un incremento en el número de capas de células epiteliales, hiperqueratosis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y papilas dérmicas bien desarrolladas (Fig. 9d).

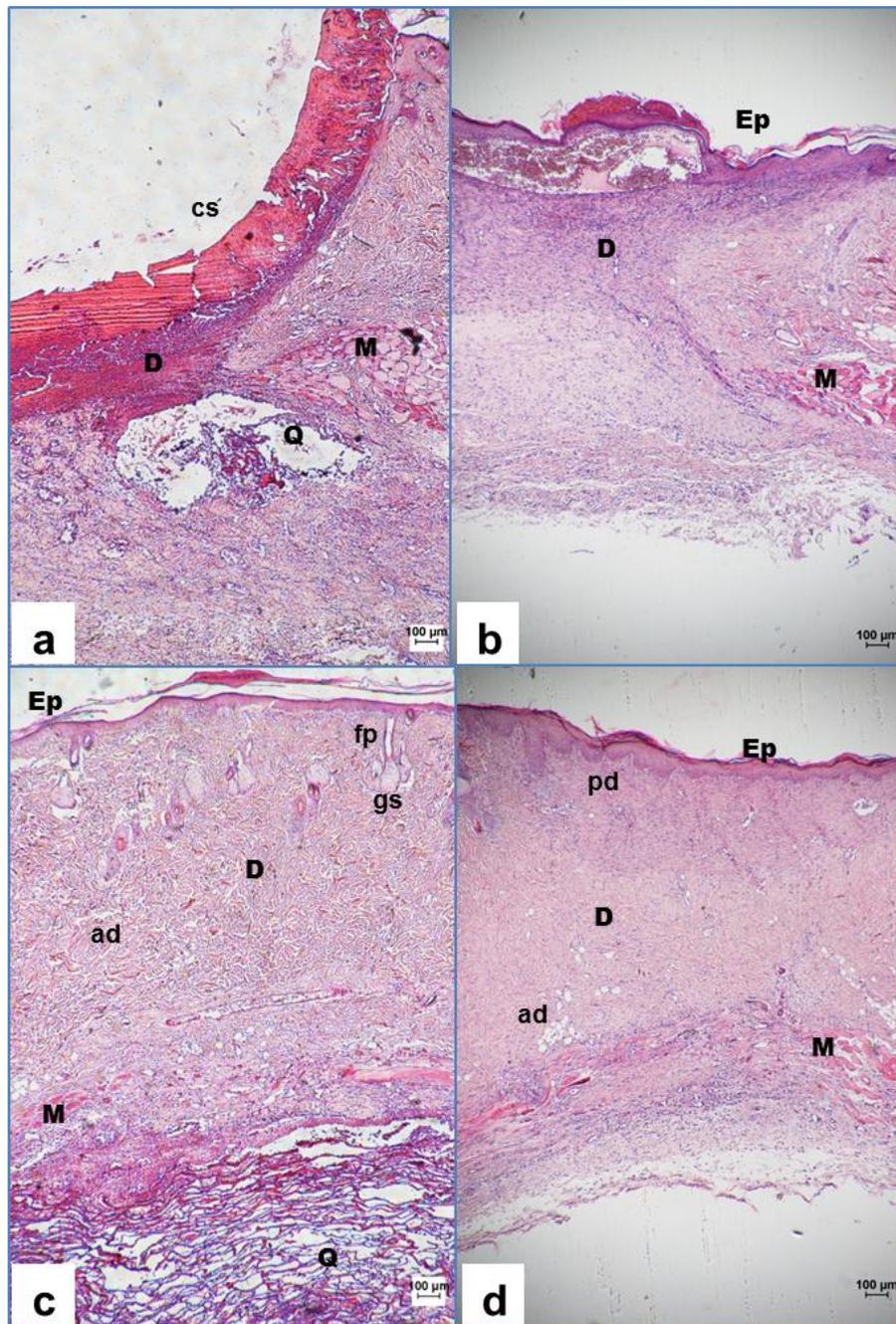


Figura 9. Micrografías de heridas de piel de ratas teñidas con H&E después de 5 (izquierda) y 10 (derecha) días. Se observan las heridas implantadas con quitosano cargado con concentraciones bajas (**a, b**) o altas (**c, d**) de rTcCRT. Al 5º día de tratamiento a baja concentración (**a**) se observó la neodermis casi ausente (**D**), una abundante costra de sangre (**cs**) y sin signos de re-epitelización. Por otro lado, la concentración más alta (**c**) mostró una neodermis madura, con adipocitos (**ad**), folículos pilosos (**fp**), glándulas sebáceas (**gs**) y papilas dérmicas (**pd**), con una completa re-epitelización (**Ep**). Esto también se observó a los 10 días con concentraciones altas (**d**), pero con una regeneración completa de la piel. La baja concentración de la proteína (**b**), en este período, presentó la dermis vascularizada inmadura y costras de sangre residual. (**Q**): quitosano; (**M**): panículo muscular. 40x

IV. Efecto de CRT en la formación de tejido de granulación, densidad celular dérmica y re-epitelización.

Después de 5 días de cicatrización en las heridas control negativo o en las heridas tratadas con menor concentración de rHuCRT, la profundidad dérmica alcanzó sólo un 13% del espesor normal de la dermis ($1,5 \pm 0,62$ mm). Mientras que en las heridas tratadas con quitosano libre de CRT se obtuvo un 40% del espesor dérmico normal, en comparación con el 75% alcanzado por las heridas tratadas con rTcCRT a bajas y altas concentraciones. Mientras que las heridas tratadas con rHuCRT a altas concentraciones, se obtuvo el 100% del espesor normal (Gráfico 2). Después de 10 días de tratamiento casi todas las heridas lograron valores cercanos al espesor dérmico normal, exceptuando las heridas tratadas con bajas concentraciones de rHuCRT y rTcCRT, alcanzando el 52% y 66% respectivamente (Gráfico 2).

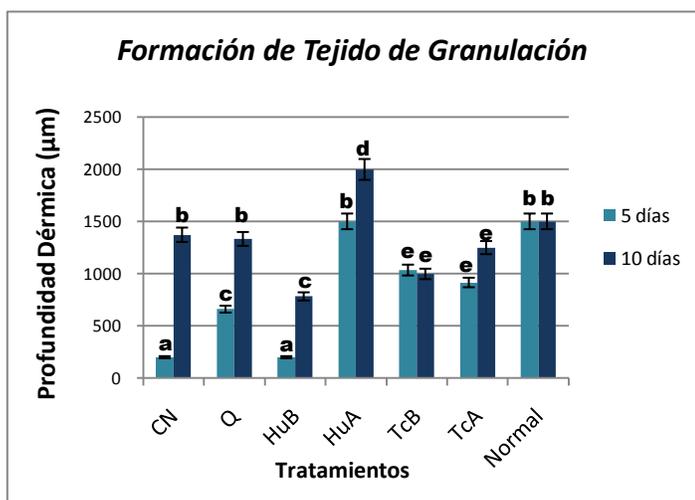


Gráfico 2. Uso de rTcCRT y rHuCRT en bajas y altas concentraciones, en la promoción *in vivo* de cicatrización de heridas al 5º y 10º día post-intervención quirúrgica. Medición de Tejido de granulación/profundidad neodérmica (µm). Tratamientos: heridas sin tratamiento, control negativo (CN); esponja de quitosano libre de CRT (Q); tratamiento de CRT humana (Hu) o parasitaria (Tc) en concentraciones bajas (B) y altas (A) (100 ng y 40 µg de rCRT respectivamente, por esponja de quitosano). Adicionalmente fueron generados 4 grupos experimentales: HuB y HuA; TcB y TcA. También se incluyó piel de rata normal (Normal). En cada columna, los valores con la misma letra no son diferentes significativamente, según lo determinado por el Test de Mann-Whitney. ($P < 0,05$).

Después de 5 días de cicatrización, en la mayoría de las heridas, la neodermis presentaba una densidad celular triplicada en comparación con la dermis normal, a excepción de las heridas implantadas con quitosano libre de CRT o con rTcCRT a bajas concentraciones, donde se

obtuvo un valor cercano al doble en densidad celular (Gráfico 3). A los 10 días, en la mayoría de las heridas, la neodermis poseía una densidad celular significativamente mayor que la dermis normal, exceptuando las heridas tratadas con rTcCRT en concentraciones bajas que tienden a la normalidad y aquellas tratadas con rHuCRT a altas concentraciones, las que alcanzaron valores de densidad celular normal (Gráfico 3).

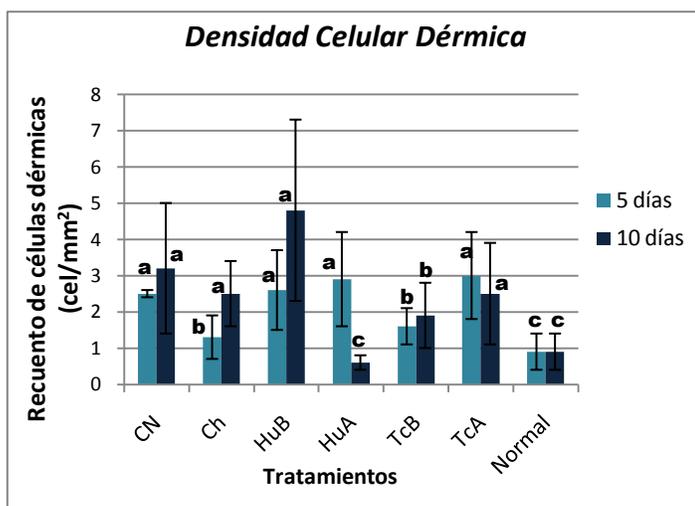


Gráfico 3. rTcCRT y rHuCRT en altas y bajas concentraciones, respectivamente en la promoción *in vivo* de cicatrización de heridas al 5º y 10º día post-intervención quirúrgica. Densidad celular dérmica (células/mm²). En cada columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes, según lo determinado por el Test de Mann-Whitney. (P <0,05).

Al quinto día de cicatrización en las heridas control negativo y aquellas implantadas con quitosano libre de CRT, se observó un porcentaje significativamente menor de revestimiento epitelial en las herida (porcentaje de re-epitelización), mientras que con baja concentración de rHuCRT se inhibe casi completamente el proceso de re-epitelización. Por lo tanto, en el proceso de revestimiento epitelial de la herida, bajas concentraciones de rTcCRT fueron más efectivas que concentraciones altas de rTcCRT. Mientras que las concentraciones altas de rHuCRT alcanzaron el 100% de re-epitelización (Imagen 8c). Después del décimo día, todas las heridas alcanzaron valores normales de re-epitelización, exceptuando las heridas tratadas con rHuCRT a bajas concentraciones (37 ± 4%) (Gráfico 4).

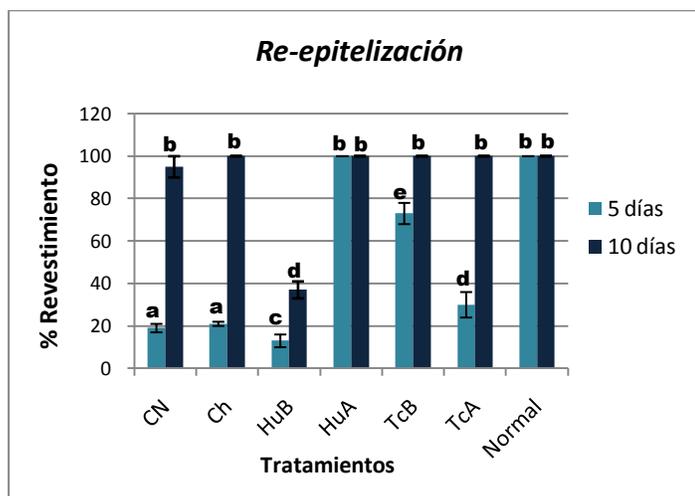


Gráfico 4. rTcCRT y rHuCRT en concentraciones altas y bajas, respectivamente en la promoción *in vivo* de cicatrización de heridas al 5º y 10º día post-intervención quirúrgica. Re-epitelización (en porcentaje). En cada columna, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes, según lo determinado por el Test de Mann-Whitney. (P <0,05).

DISCUSIÓN

Otros estudios han reportado un efecto positivo de CRT sobre la proliferación y migración de fibroblastos (Gold *et al.*, 2006; Nanney *et al.*, 2008). Estos autores demostraron que la CRT de mamíferos (humanos y conejo) ejerce efectos biológicos positivos en procesos de recuperación tanto de epidermis como dermis, promoviendo la cicatrización de las heridas. Específicamente, datos *in vitro* e *in vivo*, indican que CRT actúa en la migración y proliferación celular en el interior de la herida, en donde las células muertas son removidas. La matriz celular contribuiría a remodelar la herida y eventualmente el colágeno distribuido de manera uniforme reduciría las cicatrices. En este sentido, su efecto sobre los fibroblastos es de mayor interés, ya que son éstas células las que producen la matriz presente en el tejido de granulación, el cual rellena el defecto de la herida en la piel y proporciona un andamiaje para la migración de queratinocitos, esenciales para la re-epitelización.

La CRT induce una sobre-expresión de TGF- β 3 (Nanney *et al.*, 2008), y un incremento en el número de fibroblastos en la dermis recuperada. Dado que el TGF- β 3 posee un efecto inductivo en la mayoría de las proteínas de matriz necesarias para la adhesión y migración celular (O'Kane y Ferguson, 1997; Kinbara *et al.*, 2002), TGF- β 3 podría ser en parte, el responsable de la rápida cicatrización de heridas.

Gold *et al.*, (2006) y Nanney *et al.*, (2008) experimentaron con CRT en la cicatrización de heridas, a través de tratamientos repetidos y con concentraciones mucho más altas de CRT que las utilizadas en esta memoria.

Al comparar en esta memoria el efecto de rTcCRT y rHuCRT, por medio de un único tratamiento liberado prolongadamente mediante el uso de esponjas de quitosano en el sitio de la herida, los resultados en términos equimolares (Fig. 10) demostraron una re-epitelización más rápida que las heridas sin tratamiento de CRT, indicando una mayor reparación de las heridas. Después de 5 días de cicatrización, se detectó en algunas heridas tratadas con CRT, la presencia de islas y bordes epiteliales, además de un mayor grado de rejuvenecimiento y estratificación epidérmica (Fig. 10c). Es así como, se observó una temprana cicatrización de la herida después de sólo 5 días de tratamiento con altas concentraciones de HuCRT y concentración bajas de TcCRT. También se evidenció la madurez del tejido conectivo dérmico, con folículos pilosos, glándulas sebáceas y la epidermis completa (Fig. 9).

Los diferentes efectos de ambas CRTs, sobre la migración y proliferación de fibroblastos y cicatrización de heridas en la piel obedece, entre otras posibilidades, a la presencia de dominios no-homólogos entre CRT humana y parasitaria o, alternativamente, debido a sus diferencias conformacionales.

En resumen, en magnitud, la calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi* es más eficiente que su contraparte humana en su capacidad para incrementar la proliferación y migración celular en el proceso de cicatrización de heridas, lo que se correlaciona con un acelerado proceso cicatricial en piel de rata, como se informa en esta memoria.

Para determinar a qué se deben estas diferencias, es necesaria una investigación adicional con el fin de mapear la secuencia aminoacídica de TcCRT, y así determinar los dominios responsables de estas actividades moduladoras.

CONCLUSIONES

- El uso de calreticulina parasitaria o humana ha demostrado ser un factor que favorece el proceso de cicatrización de piel en ratas.
- Se demostró que el uso de esta calreticulina promueve la producción de neodermis, la proliferación y migración celular en el sitio de la herida, aumenta la densidad celular de la dermis y acelera la re-epitelización de la herida.
- Los resultados de su aplicación en la cicatrización de heridas de piel de ratas, son evidenciables a partir del quinto día de tratamiento tanto con rHuCRT a concentraciones altas como rTcCRT a bajas concentraciones.
- El uso de biomateriales como el quitosano, como instrumento para disminuir en número de repeticiones por tratamiento, ha demostrado ser efectivo. Comprobando su biodegradación prolongada en el sitio de la herida, ya que permaneció más allá del quinto día de tratamiento.
- En términos equimolares, el uso de calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi* indujo un acelerado proceso de cicatrización de las heridas tratadas, demostrando ser más eficaz que su contraparte humana.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres, por apoyarme todos estos años de estudio y de mi vida, a mi hermana por su ejemplo a seguir y cariño, a mi pololo por acompañarme en mis últimos años de estudio y apoyarme frente a todo. A mis amigos por todos los momentos compartidos que nunca se olvidarán; y a mis profesores, especialmente al Dr. Ignacio Arias por la oportunidad de trabajar junto a él, gracias por los consejos y confianza puesta en mí. A todos los funcionarios y profesores del Laboratorio CIMAT, muchas gracias por su tiempo, ayuda y paciencia. Y finalmente a mis profesores consejeros, por sus palabras y correcciones, entregándome el último empujón en la finalización de mi memoria.

REFERENCIAS

- Aguilar, L., Ramírez, G., Valck, C., Molina, M., Rojas, A., Schwaeble, W., Ferreira, V., Ferreira, L.** 2005. F(Ab')₂ antibody fragments against *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibit its interaction with the first component of human complement. *Biol Res* **38**:187-195.
- Aguillón, JC., Ferreira, L., Pérez, C., Colombo, A., Molina, Mc., Wallace, A., Solari, A., Carvallo, P., Galindo, M., Galanti, N., Orn, A., Billetta, R., Ferreira, A.** 2000. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulina. *Am J Trop Med Hyg* **63**:306-312.
- Bakshandeh, N., Siebert, J., Cabrera, R., Eidelman, Y., Longaker, M., Freund, R., Garg, H.** 1992. Isolation and partial characterization of hyaluronan-protein-collagen complex (HA-PC) from fetal sheep skin of different gestational ages. *Biochem Int* **28**:843-851.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, MS., Brem, H., Tomic-Canic, M.** 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* **16(5)**:585-601.
- Burd, D., Greco, R., Regauer, S., Longaker, M., Siebert, J., Garg, HG.** 1991. Hyaluronan and wound healing: a new perspective. *Br J Plast Surg* **44**:579-584.
- Chagas, C.** 1909. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1**:159-218.
- Cabrera, R., Siebert, J., Eidelman, Y., Gold, L., Longaker, M., Garg, H.** 1995. The in vivo effect of hyaluron an associated protein-collagen complex on wound repair. *Biochem Mol Biol Int.* **37**:151-158.
- Clark, R., Ghos, K., Tonnesen, M.** 2007. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *J Invest Dermatol.* **127**: 1018-1029.
- Fernández, MS., Arias, JI., Martínez, MJ., Saenz, L., Neira-Carrillo, A., Yazdani-Pedram, M., Arias, JL.** 2011. Evaluation of a multilayered chitosan-hydroxy-apatite porous composite enriched with fibronectin or an in vitro-generated bone-like extracellular matrix on proliferation and differentiation of osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med.* doi: 10.1002/term.455.

- Ferreira, V., Molina, M., 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**:1279-1291.
- Ferreira, V., Molina, Mc., Schwaeble, W., Lemus, D., Ferreira, A.** 2005. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulina modulate the complement system and angiogenesis?. *Trends Parasitol* **21(4)**:169-174.
- Gold, L., Rahman, M., Blechman, R., Greives, M., Churgin, S., Michaels, J., Callaghan, M., Cardwell, N., Pollins, A., Michalak, M., Siebert, J., Levine, J., Gurtner, G., Nanney, L., Galiano, R., Cadacio, C.** 2006. Overview of the Role for Calreticulin in the Enhancement of Wound Healing through Multiple Biological Effects. *J Investig Dermatol Symp Proc* **11**:57-65.
- Gold, L., Eggleton, P., Sweetwyne, M., Van Duyn, L., Greives, M., Naylor, SM., Michalak, M., Murphy-Ullrich, J.** 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* **24**:665-683.
- Ihara, Y., Inai, Y., Ikezaki, M.** 2011. Alteration of integrin-dependent adhesion and signaling in EMT-like MDCK cells established through overexpression of calreticulin. *J Cell Biochem* **112(9)**:2518-28.
- Kinbara, T., Shirasaki, F., Kawara, S., Inagaki, Y., de Crombrughe, B., Takehara, K.** 2002. Transforming growth factor-beta isoforms differently stimulate proalpha2 (I) collagen gene expression during wound healing process in transgenic mice. *J Cell Physiol* **190**:375-381.
- Komesu, M., Tanga, M., Buttros, K., Nakao, C.** 2004. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology* **11(2)**:63-67.
- López, N., Valck, C., Ramírez, G., Rodríguez, M., Ribeiro, C., Orellana, J., Maldonado, I., Albin, A., Anaconda, 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.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L., Opas, M.** 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **417**:651-666.

- Ministerio de Salud de Chile (MINSAL).** 2011. Vigilancia de Diabetes Mellitus tipo 2 en Chile – Reporte Nacional. [en línea] <http://epi.minsal.cl/epi/html/presenta/Taller2011/Dia3/08_VENT_DM.pdf> [consulta: 15-03-2012].
- Molina, M., Ferreira, V., Valck, C., Aguilar, L., Orellana, J., Rojas, A., Ramirez, G., Billetta, R., Schwaeble, W., Lemus, D., Ferreira A.** 2005. An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **140**:133-140.
- Nanney, L., Woodrell, C., Greives, M., Cardwell, N., Pollins, A., Bancroft, T., Chesser, A., Michalak, M., Rahman, M., Siebert, J., Gold L.** 2008. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol* **173(3)**:610-630.
- Nguyen, D., Orgill, D., Murphy, GF.** 2009. The Pathophysiologic Basis for Wound Healing and Cutaneous Regeneration. *Biomaterials for Treating Skin Loss*. CRC Press (USA) & Woodhead Publishing (UK/Europe), Boca Raton/Cambridge; p. 25-57.
- Okwueze, M., Cardwell, N., Pollins, A., Nanney, L.** 2007. Modulation of porcine wound repair with a transfected ErbB3 gene and relevant EGF-like ligands. *J Invest Dermatol* **127**: 1030-1041.
- Ostwald, T., Maclennan, D.** 1974. Isolation of a high affinity calcium-binding protein for sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **249**:974–979.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G., Apetoh, J., Perfettini, JL., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Métivier, D., Larochette, N., Van Endert, P., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., Kroemer, G.** 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13(1)**:54-61.
- O’Kane, S., Ferguson, MW.** 1997. Transforming growth factor beta-3 and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* **29**:63-78.
- Papp, S., Fadel, M., Kim, H., McCulloch, C., Opas, M.** 2007. Calreticulin affects fibronectin based cell-substratum adhesion via the regulation of c-Src activity. *J Biol Chem* **282**:16585-16598.
- Piel Artificial - Laboratorio de tejidos.** Universidad Austral de Chile. 2012. [en línea] <http://medicina.uach.cl/proyectos/piel_artificial/proyectos/avances02.php> [consulta: 20-04-2012].

- Pike, S., Yao, L., Jones, K., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G., Tosato, G.** 1998. Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth. *J Exp Med* **188(12)**:2349-2356.
- Pike, S., Yao, L., Setsuda, J., Jones, K., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Atreya, C., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G., Tosato, G.** 1999. Calreticulin and Calreticulin Fragments Are Endothelial Cell Inhibitors That Suppress Tumor Growth. *Blood* **94(7)**:2461-2468.
- Ramírez, G., Valck, C., Molina, M., Ribeiro, C., López, N., Sánchez, G., Ferreira, V., Billetta, R., Aguilar, L., Maldonado, I., Cattán, P., Schwaeble, W., Ferreira, A.** 2011. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology* **216**:265-273.
- Stefonek, T., Master, K.** 2007. Immobilized gradients of epidermal growth factor promote accelerated and directed keratinocyte migration. *Wound Repair Regen.* **15**: 847-855.
- Toledo, V., Ramírez, G., Valck, C., López, N., Ribeiro, CH., Maldonado, I., Aguilar, L., Lemus, D., Ferreira A.** 2010. Comparative in vivo antiangiogenic effects of calreticulin from *Trypanosoma cruzi* and *Homo sapiens sapiens*. *Biol. Res* **43(3)**:287-289.
- Valck, C., Ramírez, G., López, N., Ribeiro, C., Maldonado, I., Sánchez, G., Ferreira, V., Schwaeble, W., Ferreira, A.** 2010. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulina. *Mol Immunol* **47**:1516-1521.
- Villagomez, M., Szabo, E., Podcheko, A., Tifeng, T., Papp, S., Opas, M.** 2009. Calreticulin and focal-contact-dependent adhesion. *Biochem Cell Biol* **87**:545–556.